

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Unter der Anleitung von PD Dr. R. Simon

## **4q13.3 - Amplifikationen in humanen Tumoren**

### **Promotion**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg vorgelegt von:

Mareike Julia Sandmann

aus Fürth

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 20.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. E. Yekebas

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. J. Izbicki

## Inhaltsangabe

<b>Inhaltsangabe</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Tumorgenetik.....	8
1.2 Varianten genetischer und epigenetischer Veränderungen in Tumoren .....	10
1.2.1 Epigenetische Veränderungen .....	10
1.2.2 Genetische Veränderungen .....	10
1.3 Amplifikationen .....	11
1.3.1 Modelle zur Entstehung von Amplifikationen .....	14
1.3.1.1 Breakage–Fusion–Bridge Modell .....	14
1.3.1.2 Onion-Skin-Modell.....	15
1.3.1.3 Episom-Modell .....	15
1.3.1.4 Hairpin/inverted repeat-Modell .....	16
1.3.2 Methoden zur Identifizierung von Amplifikationen.....	17
1.4 4q13.3-Amplifikation in humanen Tumoren.....	19
1.4.1 Das 4q13.3-Amplikon: SNP-Daten.....	19
1.4.2 Das 4q13.3-Amplikon: Stand der Forschung .....	20
1.4.3 Das 4q13.3-Amplikon: Auswahl der Sonde.....	22
1.5 FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung).....	27
1.6 Aufgabenstellung.....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1 Das Untersuchungsmaterial .....	29
2.1.1 Multitumor-TMA.....	29
2.1.2 Ösophagus-Prognose-Tissue Microarray .....	30
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Kultivierung von BAC E.coli Klonen .....	32
2.2.2 pBAC-DNA-Extraktion aus E.coli-Flüssigkultur.....	33
2.2.3 DIG-Nick-Translation/Sondenmarkierung .....	34
2.2.4 FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung).....	35
2.2.5 Auswertung der FISH.....	38
2.2.6 Statistische Analyse .....	38
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>

3.1	Amplifikationen in humanen Tumoren .....	40
3.2	4q13.3-Amplifikation im Ösophaguskarzinom .....	41
3.3	Assoziation zum histologischen Typ.....	42
3.4	Assoziation der 4q13.3-Amplifikation zum Tumorphänotyp .....	43
3.5	Prognoserelevanz der 4q13.3-Amplifikation.....	44
3.6	Assoziation mit korrespondierenden Lymphknoten/Fernmetastasen.....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>69</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADAMTS3	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 3
ANKRD17	Ankyrin repeat domain 17
AFM	Afamin alpha-albumin
AFP	Alpha-1-fetoprotein
ALB	Albumin
Anti-DIG-AK	Anti Digoxigenin-Antikörper
AREG	Amphiregulin
(p)BAC	(plasmid) Bacterial artificial chromosome
bp	Base pairs (Basenpaare)
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CEP	Centromeric probe
(c/a)CGH	(Klassische-/Array-) komperative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
C-MYC (v-MYC)	myelocytomatosis viral oncogene homolog
CNV	Copy number variation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COT-DNA	Competitor DNA
COX2	Cyclooxygenase 2
COX18	Cytochrome c oxidase assembly protein 18
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DCK	Deoxycytidine kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EGFR/HER1(ErbB1)	Epidermal growth factor receptor
EPGN	Epigen
EREG	Epiregulin
EPHA5	EPH receptor A5
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GNAS	Guanine nucleotide binding protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HER2 (ErbB2)	Human epidermal growth factor receptor 2
HER3 (ErbB3)	Human epidermal growth factor receptor 3
HER4 (ErbB4)	Human epidermal growth factor receptor 4

---

HP-Virus	Humanes Papillomavirus
HSR	Homogenous staining region
Kb	Kilobasen
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo Dalton
LOH	Loss of heterozygosity
Mb	Megabasen
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MUC7	Mucin 7, secreted
MTHFD2L	NADP-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2-like protein
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaOH	Natriumhydroxid
NP40	Octylphenoloxypolyethoxyethanol
OPN+	Osteopontin-positiv
OPN-	Osteopontin-negativ
PARM1	Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
PBS	Phosphate buffered saline
PF4	Platelet factor 4
RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RZPD	Ressourcenzentrum Primärdatenbank
SDGF	Schwannoma-derived growth factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMR3B	Submaxillary gland androgen regulated protein 3 homologB
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (gesprochen „Snip“)
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TMA	Tissue Microarray
TP53	Tumor(suppressor Protein) 53
TWEEN	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UBE1L2	Ubiquitin-activating enzyme E1-like 2
UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Krebs-, bzw. Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stehen Tumorerkrankungen 2007 mit 26,27% der jährlichen Todesfälle in Deutschland an zweiter Stelle (Statistisches Bundesamt 2009).

Tumorerkrankungen werden je nach Ursprungszellart in verschiedene Unterklassen eingeteilt. Grob unterscheidet man Tumore epithelialen Ursprungs und Tumore nicht-epithelialen Ursprungs. In die Gruppe der nicht-epithelialen malignen Krebsarten fallen beispielsweise die Sarkome. Tumore epithelialen Ursprungs gliedern sich in Karzinome und Carzinoide. Karzinome stellen die größte Untergruppe aller malignen Tumore dar. Die Hauptgruppen der Karzinome stellen das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom dar.

Für die Therapie der Tumorerkrankungen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Beispiele hierfür sind die Chemotherapie oder die Bestrahlung. Ein Fokus der Forschung der letzten Jahrzehnte liegt auf dem Bereich der Biologika. Hierbei handelt es sich um Stoffe, welche gezielt in Vorgänge des Körpers eingreifen. Teilweise wird mit ihnen ein tumorspezifische Vorgehen ermöglicht. Durch intensives Forschen werden potentiell relevante Ziele entdeckt, neue Antikörper auf den Markt gebracht, oder bereits bekannte Biologika für einen anderen Tumor zugelassen. Tatsache ist jedoch, dass bislang nicht für jeden Tumor diese therapeutische Möglichkeit besteht (Rocha-Lima et al. 2007).

So auch im Ösophaguskarzinom, einem Tumor, welcher meist erst in einem spätem Stadium entdeckt wird und mit einer schlechten 5-Jahresüberlebensrate (ca. 5-10%) assoziiert ist (Ruf 2001). Klinische Studien zum Nutzen von Antikörpern gegen Ziele wie EGFR, VEGF, COX2 und mTOR werden bereits durchgeführt. Eine Phase III-Studie zeigt bereits einen Überlebensvorteil für eine Kombination aus Chemotherapie und Trastuzumab (HER2-Antikörper). Trotzdem fehlen für die Therapie des Ösophaguskarzinoms bislang Möglichkeiten auf diesem Gebiet und lassen hoffen, dass sich mit der Forschung neue Chancen auf tun (Ku and Ilson 2010).

## 1.1 Tumorgenetik

Die meisten Tumoren entstehen sporadisch durch Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen. In einem gesunden Zellverband herrscht in der Regel eine fein abgestimmte Balance zwischen Zellteilung, Zellwachstum, Ruhezustand und Zelluntergang/Apoptose. Gerät dieses streng kontrollierte System außer Kontrolle, kann ein Tumor entstehen.

Zu den möglichen Ursachen zählen ein inadäquates Ansprechen auf Wachstumssignale, ein Nicht-Ansprechen auf Anti-Wachstumssignale, ein nicht funktionierender Selbstschutz (z.B. der programmierte Zelltod, die Apoptose) oder aber ein Umgehen der endlichen Zellteilung (bestimmt durch die Telomere, die Chromosomenendstücke). Weiterhin besitzen Tumoren Eigenschaften wie das Vermögen zum invasiven Wachstum, der Metastasenbildung und der Angiogenese (Gefäßneubildung) (Hanahan and Weinberg 2000).

Eine Tumorzelle verschafft sich durch einen oder mehrere dieser Mechanismen einen Wachstumsvorteil. Die erworbenen genetischen Eigenschaften werden auf die Tochterzelle weitergegeben und nehmen im Laufe der Zellgenerationen in ihrer Anzahl zu. Im Regelfall kann es erst bei Überschreitung einer kritischen Anzahl von tumorrelevanten Mutationen zur Ausbildung von Malignität kommen. Diese Vorstellung der Tumorentstehung wird in der anerkannten „Mehrschnitt-Karzinogenese“-Theorie vertreten. Man geht davon aus, dass mindestens 5-10 genetische Veränderungen stattfinden müssen, bis es in einer Zelle zu einer malignen Entartung kommen kann. Dies erklärt auch die hohen Inzidenzraten von Malignomen im fortgeschrittenen Alter. Zusätzlich weisen Tumorzellen oft eine genetische Instabilität auf, welche die Ansammlung von Mutationen begünstigt (Renan 1993).

Man geht davon aus, dass das menschliche Genom in etwa 3000-5000 proteinkodierende Gene besitzt, welche in Tumorzellen fehlreguliert sein können. Eine Vielzahl hiervon wurde bis dato erforscht. Alterierte Gene können entweder zur Produktion eines veränderten Proteins, mit oder ohne Funktion, oder zur vermehrten, bzw. verminderten Produktion eines unveränderten Proteins führen (Boyle 2008).

Nicht jede genetische Veränderung wirkt sich phänotypisch aus, noch ist jede Veränderung für die Tumorentstehung relevant. Jeder Tumor hat ein individuelles Muster an mutierten Genen. Nie sind alle malignitätsrelevanten Gene in einem singulären Tumor verändert. Dieses individuelle Potpourri an Genen eines jeden Tumors kann diagnostisch und therapeutisch genutzt werden.

Gene, welche im Rahmen der Tumorgenese eine Rolle spielen, können in vier wichtige Gruppen eingeteilt werden: **Onkogene, Tumorsuppressorgene, mismatch repair Gene** und **mitose checkpoint Gene**.

**Onkogene** spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Ihre Genprodukte stimulieren das Zellwachstum und ihre Translation wird in einer normalen Zelle streng kontrolliert. Drei wichtige molekulare Mechanismen können zu einer Onkogenaktivierung führen: Die Punktmutation, die Genamplifikation und die Chromosomentranslokation/-insertion (Hesketh 1997). Dies führt zu einer übermässigen Produktion eines Proteins oder zu einer Produktion eines abnormen, überaktiven Proteins. Durch das vermehrt vorhandene Protein besteht über verschiedene Mechanismen die Tendenz zu einem unkontrollierbaren Zellwachstum, oder aber zur Unterbindung der Apoptose (Hesketh 1997). Ein bekanntes Onkogen ist das amplifizierte ErbB2-Gen (HER2), welches einen Wachstumsrezeptor codiert (Reichert et al. 2007).

**Tumorsuppressorgene** unterdrücken an verschiedenen Stellen den Zellzyklus und verhindern ein übermässiges Zellwachstum. Im Gegensatz zu den Onkogenen handelt es sich bei den Tumorsuppressorgenen um rezessive Gene (siehe Abbildung 1). Um die Genexpression dieser rezessiven Gene zu hemmen (McIntyre et al. 2010), müssen nach der Knudson'schen *Two Hit*-Hypothese beide Allele durch einen zweistufigen Prozess inaktiviert werden (Knudson 2000). Der Verlust des ersten Allels führt zu einem unbemerkten Verlust der Heterozygotität (LOH = loss of heterozygosity). Durch ein weiteres genetisches oder epigenetisches Ereignis wird auch das zweite Allel ausgeschaltet. Erst dann ist das Gen inaktiviert (Hesketh 1997). Ein bekanntes, in vielen Tumoren inaktiviertes Tumorsuppressorgen ist das TP53/p53-Gen (Petitjean et al. 2007).

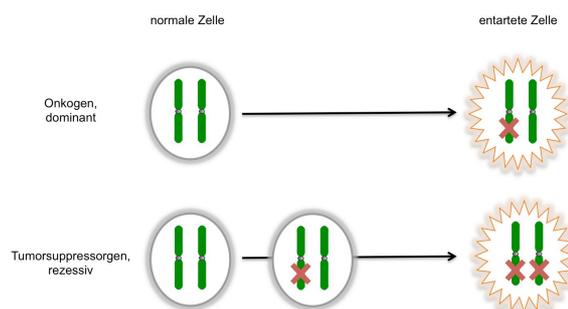


Abbildung 1: **Mechanismen zur Entstehung von entarteten Zellen**, modifiziert nach Hesketh, 1997

**Mismatch repair Gene** beheben Fehler, welche während der DNA-Replikation stattgefunden haben. Die Inaktivierung beider Kopien dieser rezessiven Gene führt zu einem defekten DNA-Reparaturmechanismus (Hesketh 1997). Durch mangelhafte

Reparaturkapazität wird die Akkumulation weiterer Mutationen begünstigt (Hsieh and Yamane 2008; Jascur and Boland 2006).

**Mitose checkpoint Gene** kontrollieren bei der Zellteilung die korrekte Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (Tao 2005). Besteht ein Defekt in diesem System, kommt es zu chromosomalen Instabilitäten und einer abnormen Chromosomenanzahl in den Zellen (Aneuploidy) (Cahill et al. 1998). Dies ist ein häufiges Phänomen in Malignomen (Koppert et al. 2005).

## 1.2 Varianten genetischer und epigenetischer Veränderungen in Tumoren

Bei Mechanismen, welche zu Funktionsstörungen eines Gens führen, können zwei Ebenen unterschieden werden. Die erste Ebene betrifft die DNA-Sequenz selbst (**genetisch**), die zweite Ebene betrifft den Aktivitätszustand des Gens ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz (**epigenetisch**). Durch epigenetische Mechanismen kann ein Gen „ein- und ausgeschaltet“ werden, und somit die Expression des Genproduktes beeinflusst werden (Boyle 2008).

### 1.2.1 Epigenetische Veränderungen

Zu den epigenetische Veränderungen gehören die DNA-Methylierung, die Alkylierung von Histonen und die Inhibierung der Expression durch mikro-RNA (Boyle 2008; Taby and Issa 2010). Die häufigste epigenetische Veränderung ist die Methylierung. Die DNA-Methylierung kann vermindert (Hypomethylierung) oder erhöht (Hypermethylierung) sein (Toyota and Suzuki 2010). Sie spielt auch in der ursprünglichen, nicht veränderten Zelle eine wichtige Rolle zur Regulierung der Genexpression. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Inaktivierung eines X-Chromosoms im weiblichen Geschlecht (Taby and Issa 2010). Betrachtet man einen Tumor, übersteigt die Anzahl der epigenetisch veränderten Gene deutlich die der mutierten. Im humanen Genom wird eine bestimmte Sequenz, die sogenannten CpG-Inseln, bevorzugt methyliert (Boyle 2008). Solche Bereiche befinden sich besonders häufig in Promoterregionen. Hypermethylierung eines Promoters führt in der Regel zu einer Inaktivierung des Gens. Ein bekanntes Beispiel ist die Hypermethylierung des p16-Promoters (Boyle 2008).

### 1.2.2 Genetische Veränderungen

Genetische Veränderungen finden auf DNA-Ebene innerhalb der Sequenz statt. Spontane oder induzierte Änderungen des Erbgutes können mehrere Gene (**chromosomale Aberrationen**) oder einzelne Gene (**Genmutationen**) betreffen. Es existieren

verschiedenen Ursachen für spontane genomische Veränderungen, wie beispielsweise Strahlung, chemische Substanzen oder Viren. Teilweise können diese Veränderungen von DNA-Reparaturmechanismen korrigiert werden (Buselmaier 2007). Sind diese jedoch gestört, kommt es wiederum vermehrt zu Mutationen (Jascur and Boland 2006).

### **1.3 Amplifikationen**

Im Rahmen dieser Arbeit interessiert besonders der Mechanismus der Genamplifikation für die Entstehung und Progression von Tumoren. Amplifikationen finden sich häufiger in soliden Tumoren, Translokationen hingegen häufen sich in hämatologischen Erkrankungen (Myllykangas and Knuutila 2006). Bei Amplifikationen handelt es sich um chromosomale, abnormale Strukturen, in denen eine erhöhte Kopienzahl eines chromosomalen Bereiches vorliegt. In der Regel haben diese Abschnitte eine Länge von etwa 0,5-10Mb (Lengauer et al. 1998) und können ein solitäres Gen, sowie ganze genomische Bereiche umfassen. Durch das zusätzlich vorhandene Genmaterial kommt es in der Regel auch zur vermehrten Expression des Proteins. Jedoch besteht nicht immer eine direkte Proportionalität der DNA-Kopienzahl zur produzierten Proteinmenge (Shimizu 2009).

Amplifikation ist einer der wichtigsten Mechanismen zur Aktivierung von Onkogenen und dem Erwerb einer Medikamentenresistenz in Tumorzellen. Das Vorhandensein von Amplifikationen in Tumoren kann einen prognostischen, diagnostischen und therapeutischen Wert haben (Mondello et al. 2010).

Manche Tumorzellen weisen einen Wachstumsvorteil durch eine erhöhte Aktivität der Telomerase auf. Es konnte gezeigt werden, dass Amplifikationen des Telomerase-Gens Ursache hierfür sein können (Mondello et al. 2010).

Bei Säugetieren werden keine Amplifikationen in gesunden, normalen Zellen beobachtet und gelten daher als Ausdruck von Störungen der genetischen Integrität (Albertson 2006). Neben Tumorzellen gibt es Hinweise, dass Amplifikationen auch in Keimzellen auftreten können (Mondello et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass in der gesunden Zelle Mechanismen zur Verhinderung von Amplifikationen bestehen. Diese sind in Tumorzellen ausgeschaltet oder verloren gegangen (Mondello et al. 2010). Weiterhin treten Amplifikationen tendenziell eher im Spätstadium der Tumorentstehung auf (Myllykangas and Knuutila 2006).

Im Gegensatz dazu sind Amplifikationen bei niedrigeren Lebewesen auch in gesunden Zellen bekannt. Dies lässt schliessen, dass die Amplifikation nicht zwingend ein

pathologischer, deregulierter Prozess ist, sondern vielmehr einen gezielten Mechanismus zur Steigerung der Expressionsrate darstellt, welcher physiologisch auftritt und zu einem koordinierten Entwicklungsprogramm beiträgt (Stark et al. 1989).

Eine Amplifikation kann sich in drei verschiedenen Lokalisations-Typen manifestieren: intrachromosomal hintereinandergeschaltet (sogenannte **HSRs: homogenous staining regions**, sich homogen anfärbende chromosomale Regionen), intrachromosomal diffus verteilt oder aber auch extrachromosomal (sogenannte „**double minutes**“) (Albertson 2006) (siehe Abbildung 2).

Double minutes besitzen einen eigenen Replikationsursprung und können sich eigenständig replizieren. Sie besitzen in der Regel kein Zentromer und werden somit bei der Zellteilung nicht gleichmässig, sondern zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch können sie bei der Zellteilung „verloren“ gehen. Tragen sie jedoch Gene in sich, welche der Zelle einen Wachstumsvorteil verschaffen, kommt es zur Selektion und ein klonales Wachstum kann provoziert werden (Mondello et al. 2010). Als sogenanntes „Episom“ können sich die extrachromosomalen Abschnitte in das Ursprungschromosom reintegrieren (intrachromosomal) (Albertson 2006).

Double minutes und homogenous staining regions liegen in der Regel nicht simultan in einer Zelle vor (Stark and Wahl 1984). Double minutes treten in primären Tumoren häufiger auf als homogenous staining regions (Stark et al. 1989; Tanaka and Yao 2009; Wahl 1989). Intrachromosomale Amplifikationen können, müssen aber nicht an ihrem Ursprungsort/-chromosom vorliegen.

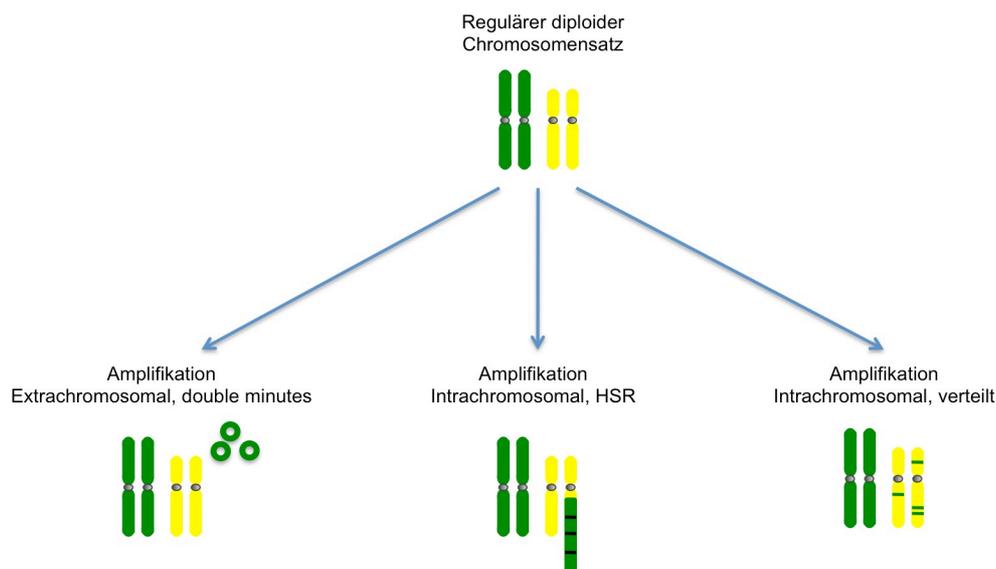


Abbildung 2: Die drei Amplifikationstypen, modifiziert nach: (Albertson 2006).

Die genauen Mechanismen zur Entstehung von Amplifikationen in Tumorzellen sind noch nicht bekannt. Eine hohe Diversität und Komplexität in Struktur, Lage und Aufbau der Amplikone lässt mehrere unabhängige, oder kombinierte Mechanismen vermuten. Amplifizierte DNA-Abschnitte zeigen abnorme Strukturen, wie beispielsweise neue Verknüpfungen oder invertierte Genabschnitte. Amplifikationen sind oft mit anderen chromosomalen Aberrationen vergesellschaftet. Sie können auch sekundär, nach Entstehung der Amplifikation, auftreten, was eine Erforschung des Ursprungsmechanismus stark erschwert und seit Jahrzehnten die Wissenschaft beschäftigt (Haber and Debatisse 2006).

Ein möglicher Ausgangspunkt für die Entstehung einer Amplifikation ist das kritische Ereignis eines Doppelstrangbruchs. Dies ist ein bekanntes Phänomen in sich häufig teilenden Tumorzellen. Doppelstrangbrüche wiederum können durch ionisierende Strahlung oder andere physikalische/chemische Noxen induziert werden (Mondello et al. 2010; Myllykangas and Knuutila 2006). Weiterhin wird vermutet, dass innerhalb des Genoms Sequenzen existieren, welche das Auftreten von Doppelstrangbrüchen begünstigen (Myllykangas and Knuutila 2006). Sie bestehen oft aus einer AT (Adenin und Thymin)-reichen Sequenz und finden sich angrenzend an amplifizierte Bereiche (Haber and Debatisse 2006). Spezifische Gene, welche zu dieser genetischen Instabilität führen, konnten bislang nicht identifiziert werden (Albertson 2006; Mondello et al. 2010). In vielen Tumorzellen herrscht ein gestörter Reparaturmechanismus. Bei dem Verlust des p53-Gens besteht eine vermehrte Neigung zur Bildung von Amplifikationen (Livingstone et al. 1992; Mondello et al. 2010; Yin et al. 1992).

Im Laufe der Zeit wurden mehrere Theorien zum Entstehungsmechanismus von Amplifikationen aufgestellt. Der double rolling circle, bekannt aus der Replikation von Plasmid-DNA, konnte noch nicht in humanen Tumorzellen (Kuwahara et al. 2004), jedoch in Hefezellen nachgewiesen werden (Watanabe and Horiuchi 2005). Gehalten hat sich die Theorie der homologen Rekombination, bei der es zu einer unbalancierten Rekombination der Schwesterchromatiden kommt (Stark and Wahl 1984). Hierbei entsteht ein amplifizierter Bereich, in welchem die DNA-Abschnitte in der gleichen Richtung („head-to-head“) arrangiert sind (Mondello et al. 2010).

Vier der wichtigsten Modelle zur Entstehung von Amplifikationen sollen nachstehend beschrieben werden: **das Breakage-Fusion-Bridge-Modell, das Episom-Modell, das Onion-Skin-Modell und das Haarnadel/inverted repeat-Modell.**

### 1.3.1 Modelle zur Entstehung von Amplifikationen

#### 1.3.1.1 Breakage-Fusion-Bridge Modell

Das Breakage-Fusion-Bridge-Modell wurde in Ansätzen bereits 1941 von McClintock beschrieben (McClintock 1941). Unter den genannten Mechanismen, die zu einer intrachromosomalen Amplifikation führen, ist das Breakage-Fusion-Bridge-Modell das anerkannteste (siehe Abbildung 3). Ausgangspunkt für eine Amplifikation ist in der Regel ein Doppelstrangbruch. Den vier DNA-Bruchstellen fehlen Telomere, welche die Tendenz haben, sich einen Fusionspartner zu suchen. *Lo et al.* konnten an humanen Karzinomzellen zeigen, dass auch ein primärer Telomerverlust Ausgangspunkt für das Breakage-Fusion-Bridge-Modell sein kann (Lo et al. 2002). Durch die instabilen Doppelstränge kommt es entweder zur Reparatur und korrekten Wiederherstellung der Chromosomen, oder aber zur Fusion der Schwesterchromatiden. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Fusion der Schwesterchromatiden ein instabiles, dizentrisches Singlechromosom (ein Chromosom mit zwei Zentromeren) entsteht, welches durch intrachromosomale mechanische Spannungen erneut, nahe der alten Bruchstelle, zerbricht. Dadurch kommt es zu einer ungleichmässigen Verteilung der DNA auf die jeweiligen Schwesterchromatiden.

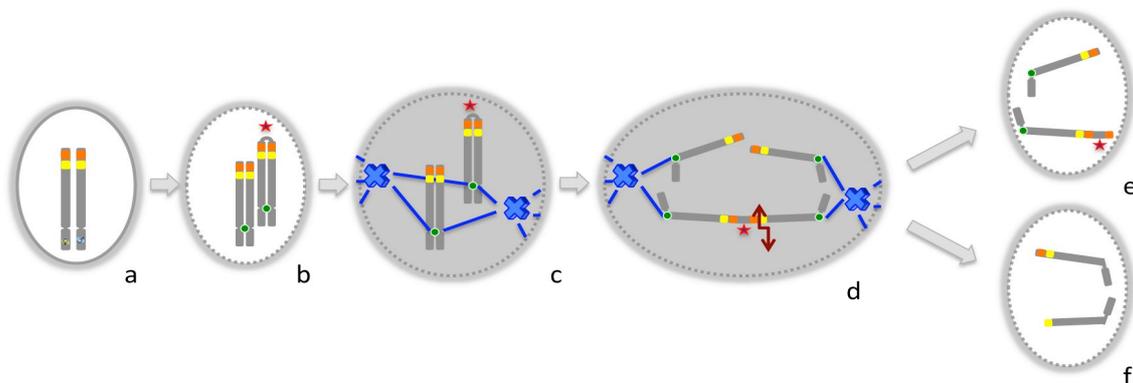


Abbildung 3: **Breakage-Fusion-Bridge-Modell** Gelb/orange: Genbereich, grün: Zentromer, blau: Spindelapparat, Stern: Brückenbildung zwischen Schwesterchromatiden **a:** 1 diploides Chromosomenpaar, rechts vom Vater, links von der Mutter, **b:** Replikation, Brückenbildung zwischen zwei Schwesterchromatiden, ausgelöst durch z.B. einen Doppelstrangbruch, **c:** beginnende Separation der Schwesterchromatiden durch den Spindelapparat in der Mitose, **d:** mechanische Kräfte wirken auf die Brücke zwischen den beiden Schwesterchromatiden, **e/f:** Entstehung zwei neuer Tochterzellen mit doppeltem Genmaterial (orange) (**e**) und verlorenem Genmaterial (**f**). Modifiziert nach (Coudert 2007)

Durch Wiederholung in mehreren Zellzyklen sammelt sich eine Vielzahl von Kopien eines DNA-Abschnittes in einem Bereich des Chromosoms an und bilden eine Amplifikation. Beherbergt dieses Onkogene, besitzt die Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den

Zellen ohne Amplifikation. Im weiteren Verlauf kommt es zur positiven Selektion (Mondello et al. 2010).

Durch das Breakage-Fusion-Bridge-Modell entstandene Amplifikationen stellen sich typischerweise als intrachromosomale, clusterartige und relativ schmale Amplikone dar (homogeneously staining regions) (Shimizu 2009; Tanaka and Yao 2009). Das genetische Material distal der Amplifikation ist durch den Durchlauf der Zyklen verloren gegangen. In der Struktur der Amplifikationen zeigen sich umgekehrte, aneinandergereihte und sich wiederholende DNA-Sequenzen (Mondello et al. 2010). In klassischen zygotenetischen Metaphasechromosomendarstellung erscheint der amplifizierte Bereich als eine vergrößerte, gleichmässig angefärbte Chromosomenbande.

### 1.3.1.2 Onion-Skin-Modell

Das Onion-Skin-Modell (engl. Zwiebelhaut) erklärt die Entstehung sowohl von intra- als auch von extrachromosomalen Amplifikationen. Ursprünglich wurde dieses Modell 1985 bei *Drosophila follicular* nachgewiesen. Beginnend mit einer fehlerhaften Replikationsgabel wird innerhalb eines Zellzyklusses an mehreren Orten überschüssend DNA repliziert (Carroll et al. 1988; Stark and Wahl 1984) (siehe Abbildung 4).

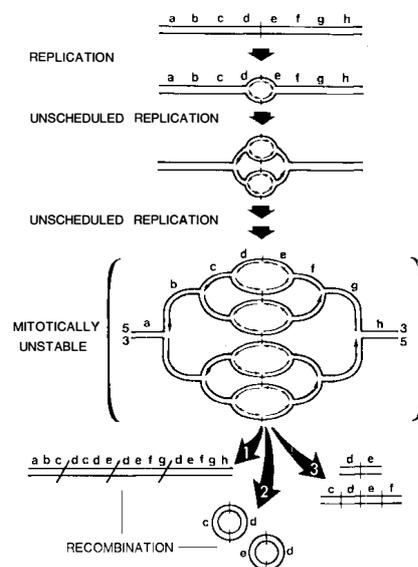


Abbildung 4: **Onion-Skin-Modell:** Fehlerhafte Replikationsgabel, Ausbildung von intra- (HSRs) und extrachromosomalen (Episomen) Amplifikationen. Quelle: (Stark and Wahl 1984).

### 1.3.1.3 Episom-Modell

Das Episom-Modell wurde in den 80er-Jahren aufgestellt. Durch Strangbrüche kommt es zur Deletion des betroffenen Genomausschnittes. Dieser schliesst sich als Kreis

zusammen und liegt als double minute oder auch Episom extrachromosomal vor. Double minutes sind im Gegensatz zu den kleineren Vorgängern, den Episomen (ca. 250bp), in der konventionellen Zytogenetik sichtbar (Reddy 2007; Wahl 1989). *Wahl et al.* gehen davon aus, dass es sich bei der Formation von Episomen, bzw. double minutes, um frühe Ereignisse in der Entstehung von Amplifikationen handelt. Double minutes können auch in das Genom reintegriert werden und somit zur Ausbildung einer homogeneously staining region führen. Umgekehrtes wurde bisher noch nicht beobachtet. Das bedeutet, dass aus homogeneously staining regions keine extrachromosomale Amplifikationen (Episomen) entstehen können.

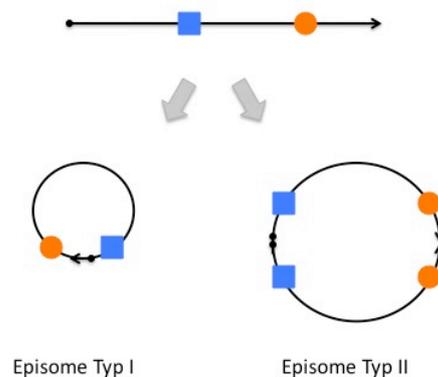


Abbildung 5: **Episom-Modell**. Es kommt zum Strangbruch, zur Deletion des Abschnittes, Zirkularisation und Amplifikation. Darstellung der zwei Typen der Episomen. Modifiziert nach: (Wahl 1989).

#### 1.3.1.4 Hairpin/inverted repeat-Modell

Innerhalb des Genoms von Tumoren existieren verschieden lange palindromartige Sequenzen (DNA-Abschnitte, die in beide Richtungen gelesen die gleiche Basensequenz vorweisen). Diese können Ausgangspunkt für Amplifikationen sein (Tanaka et al. 2005). Auch kürzere, palindromartige DNA-Abschnitte (4-13bp) (sogenannte **inverted repeats**) können zur Ausbildung von Amplifikationen führen. Kommt es in der Nähe zum Doppelstrangbruch, klappt der Einzelstrang um, legt sich an den Schwesterstrang und bildet so einen **hairpin** (Haarnadel) (Okuno et al. 2004). Eine zweite Möglichkeit wäre die Bildung einer intrachromosomalen Kreuzformation (sogenannte *holliday junction*, nach dem Erstbeschreiber benannt) mit darauffolgender Ausbildung eines hairpins (siehe Abbildung 6). Die folgende DNA-Replikation führt zur Ausbildung eines Palindroms (größere Form des inverted repeats) (Haber and Debatisse 2006; Reddy 2007; Tanaka and Yao 2009). Zur genauen Bedeutung in der Tumorgenese bedarf es jedoch noch weiterer Studien (Mondello et al. 2010).

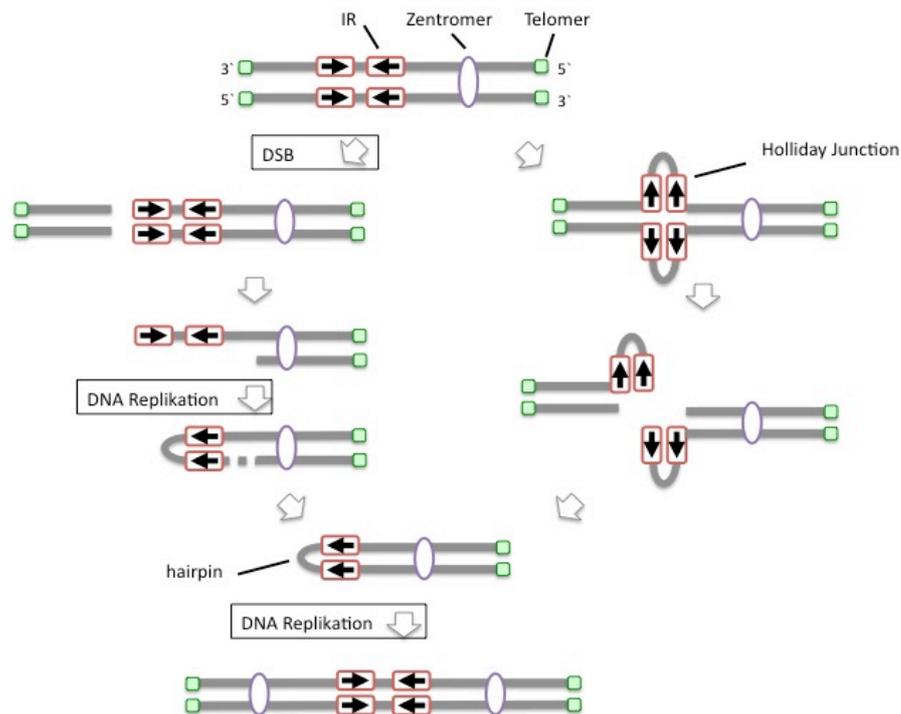


Abbildung 6: **Hairpin/Inverted repeat-Modell**. DSB: Doppelstrangbruch, IR: inverted repeat. *Links*: Ein Doppelstrangbruch führt zur Deletion eines Allels und Bildung eines hairpins der beiden Schwesterchromatiden. *Rechts*: Bildung eines hairpins innerhalb eines Chromatids durch Aneinanderlagerung der inverted repeats. Doppelstrangbruch. *Gemeinsame Endstrecke (unten)*: Hairpin, folgende Replikation mit Ausbildung eines dizentrischen, palindromischen Chromosoms. Quelle: modifiziert nach: (Tanaka and Yao 2009).

### 1.3.2 Methoden zur Identifizierung von Amplifikationen

Die **Zytogenetik** ist ein Teilgebiet der Genetik und beschäftigt sich mit der lichtmikroskopischen Beurteilung von Chromosomen. Grundlage hierfür war die Entwicklung einer Färbemethode mit Giemsa zur Darstellung der Metaphasechromosomen und die Entdeckung ihres spezifischen Bandenmusters in den 50er-Jahren. Dadurch konnte jedes Chromosom charakterisiert und jede Bande benannt werden. Die Auflösung bandenspezifischer Veränderungen, wie unter anderem Amplifikationen, liegt in etwa bei 20Mb (Myllykangas and Knuutila 2006).

Die komperative genomische Hybridisierung (**comparative genomic hybridization: CGH**) dient, wie die klassische Zytogenetik, der Darstellung von Zugewinnen oder Verlusten von chromosomalem Material. Im Gegensatz zur Zytogenetik arbeitet sie mit

isolierter DNA. Die zu testende DNA kann aus frischen oder konservierten Gewebeproben extrahiert werden. Es bedarf keiner aufwendigen Zellkultivierung. Alle Chromosomen können in einem einzelnen Experiment analysiert werden, so dass sich die CGH als Technik zum schnellen Durchsuchen des Genoms verbreitet hat (Michels et al. 2007).

Anfang der 90er-Jahre wurde die klassische Chromosomen-CGH (cCGH) als neue molekular-zytogenetische Methode vorgestellt (Kallioniemi et al. 1992). Hierbei wird unterschiedlich fluoreszierende Test- (Tumor-) DNA und Referenz-DNA (normale DNA) auf Metaphasechromosomen kohybridisiert. Die danach automatisch gemessene Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Menge der gebundenen DNA und gibt somit Aufschluss über das Vorliegen von chromosomalen Imbalanzen. Amplifikationen, Deletionen, Duplikationen und unbalancierte Translokationen können so detektiert und ihrem chromosomalen Ort zugewiesen werden (Kallioniemi et al. 1992). Limitierend ist die Größe der Deletion oder Amplifikation. Die Region darf nicht kleiner als 5-10 Mb sein (Kallioniemi et al. 1992).

Als Weiterentwicklung wurde 1997/98 die Microarray-basierte CGH (Array- oder Matrix-CGH, aCGH) eingeführt (Pinkel et al. 1998; Solinas-Toldo et al. 1997).

Mikroarrays werden in der Regel von Robotern hergestellt, welche kleine Mengen an DNA in sogenannten Spots (Punkt-Form) nebeneinander auf eine Matrix aufbringen und fixieren. Diese Spots werden dann mit der Test-/Referenz-DNA hybridisiert. Hierfür werden in der Regel Sequenzen aus bakteriellen, künstlichen Chromosomen (BAC) (Cai et al. 2002), cDNA-Klone (Pollack et al. 1999) oder Oligonukleotiden (Carvalho et al. 2004) verwendet. Die höchste Auflösung (ca. 35kB) wurde mit der Verwendung von Oligonukleotiden erreicht (Myllykangas and Knuutila 2006).

Da die CGH auf einen Vergleich von Tumor-DNA und Referenz-DNA basiert, können nur qualitative und keine quantitativen Veränderungen erkannt werden. Balancierte Translokationen, Polyploidien, Mosaik und die genaue Verteilung der beiden Allele werden nicht erkannt (Ratio der Intensitäten: 1,0) (Speicher and Carter 2005).

Eine spezielle Mikroarray-Art, welche auch mit Oligonukleotiden arbeiten, stellen die **SNP-Arrays** (Single Nucleotid Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismen, gesprochen: *Snip*) dar. Ursprünglich wurden SNP-Arrays zur Genotypisierung in der Humangenetik verwendet (Speicher and Carter 2005). Einzelnukleotid-Polymorphismen stellen die, bei weitem häufigste Form einer genetischer Variation beim Menschen dar. Eine SNP liegt dann vor, wenn an einer genomischen Stelle eine Base verändert vorliegt (Bsp: Sequenz AAGGCT und ATGGCT). Um einen SNP von einer simplen Variante oder

einer Punktmutation zu unterscheiden, gilt in der Regel die Bedingung, dass das seltenere Allel mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in zumindest einer Population auftreten muss (Department of Energy Genome Programs 2008).

Insgesamt sind ca. 3 Millionen SNPs über das menschliche Genom verteilt. Sie machen etwa 90% der Diversität des menschlichen Genotyps aus (Department of Energy Genome Programs 2008). Die Verteilung der SNPs über das Genom ist nicht gleichmässig. SNPs treten häufiger in nicht-kodierenden als in kodierenden Bereichen auf (Kim and Misra 2007). Weiterhin verhalten sich SNPs genetisch stabil, dass heisst sie verändern sich über mehrere Generationen kaum. Diese Eigenschaften macht man sich zunutze, um mittels SNPs eine individuelle Kartographierung des Genoms und seinen Veränderungen zu ermöglichen (Zhou et al. 2005).

Bei dieser Methode sind Oligonukleotide von SNPs auf Gen-Chips (Firma *Affymetrix*®) gebunden. Die Methode hat eine hohe Anforderung an die Qualität der DNA, welche idealerweise aus frischen oder gefrorenen Tumorproben gewonnen wird. Die DNA-Qualität formalinfixierten Gewebes ist teilweise für hochauflösende SNP-Arrays noch nicht ausreichend (Dutt 2007). Da eine allelspezifische Analyse des Genoms stattfindet, lassen SNP-Arrays eine Aussage über den Genotyp (AA, BB oder AB), und somit eine Aussage über eine LOH (loss of heterozygosity) zu (Speicher and Carter 2005). Polyploidien und balancierte Translokationen können auch hier nicht erkannt werden.

Im Gegensatz zur CGH wird nur mit der Test-DNA hybridisiert. Um eine Veränderung des Genmaterials zu entdecken, wird mit einer unabhängigen Kontrollhybridisierung verglichen (Speicher and Carter 2005). SNP-Arrays besitzen eine höhere Auflösung (ca. 23,5 kB) (Myllykangas and Knuutila 2006) als die speziell für die aCGH hergestellten Chips und haben deswegen diese heute weitestgehend verdrängt.

## **1.4 4q13.3-Amplifikation in humanen Tumoren**

### **1.4.1 Das 4q13.3-Amplikon: SNP-Daten**

Mittels SNP-Array *Affymetrix*® *Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0* wurde in einem von 15 Ösophagustumoren das 4q13.3-Amplikon entdeckt (Fall Nr. 3332, Plattenepithelkarzinom). Ein analoges Amplikon ist in einem von 20 Harnblasenkarzinomen (Fall Nr. bladder\_L1870) identifiziert worden. Die SNP-Daten wurden im Vorfeld am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf erhoben und gehören nicht zum praktischen Teil dieser Arbeit. Der überlappende Bereich der Amplikone umfasst ca. 2,06 Mb (Beginn: 76194347bp, Ende: 74139280bp). Der

Bereich beinhaltet 21 Gene: COX18, ANKRD17, ALB, AFP, AFM, RASSF6, IL8, CXCL6, PF4V1, CXCL1, PF4, PFBP, CXCL5, CXCL3, CXCL2, MTHFD2L, EPGN, EREG, AREG, BTC und PARM1 (Quelle: fish Oracle ©, Institut für Pathologie, UKE Hamburg)

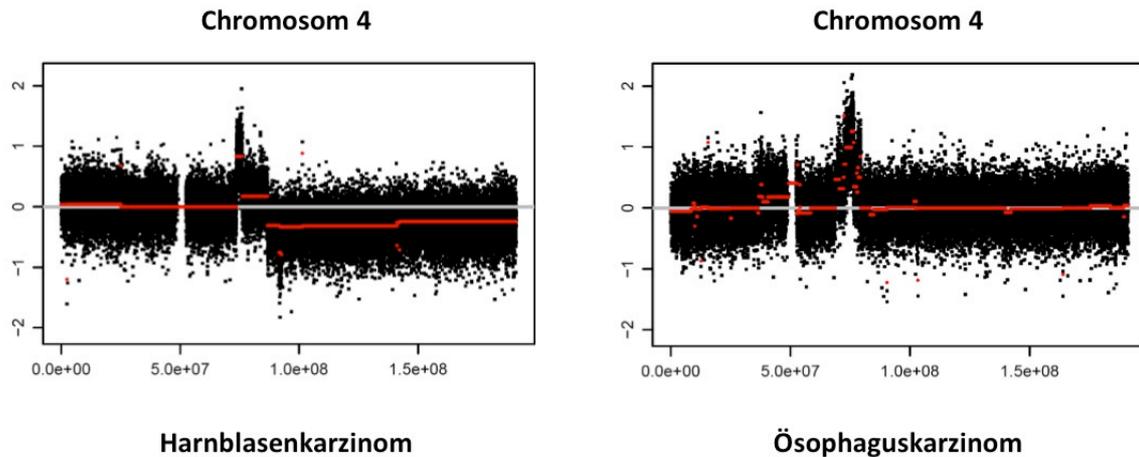


Abbildung 7: **Auswertung der SNP-Daten, Chromosom 4** aus dem Fall Nr. bladder\_L1870 (*links*) und dem Fall Nr. 3332 (Ösophagus) (*rechts*).

#### 1.4.2 Das 4q13.3-Amplikon: Stand der Forschung

Im 4q-Bereich finden sich in vielen Tumorentitäten meist DNA-Verluste/LOHs, seltener DNA-Zugewinne (Struski et al. 2002). Direkt den 4q13.3-Bereich betreffend ergab die Literatursuche auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> wenig Treffer. Daher wird angenommen, dass das von uns gefundene 4q13.3-Amplikon ein relativ unbekanntes seiner Art ist.

Verluste im Bereich 4q13.3 wurden beispielsweise im Zervixkarzinom (Narayan et al. 2007), im hepatozellulären Karzinom (HCC) (Chan et al. 2006; Sun et al. 2008), in Gliomen (Roversi et al. 2006), in Mammakarzinomzelllinien (Jonsson et al. 2007), in Larynxkarzinomzelllinien (Jarvinen et al. 2006), sowie im Plasmozytom/MGUS (Carrasco et al. 2006; Cheng et al. 2007) beschrieben.

Im Zervixkarzinom konnten *Kraus et al.* zeigen, dass 4q13.3 ein häufiger Ort für die Integration des HP-Virus ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei 4q13.3 um einen Ort genomischer Instabilität handelt (Kraus et al. 2008).

*Vauhkonen et al.* berichten von einer 4q13.3-Amplifikation in einer von 15 Magenkarzinomproben. Im Amplikon enthaltene Gene waren ADAMTS3, ANKRD17, Mitglieder der CXCL-Familie und DCK (Vauhkonen et al. 2006). DCK (deoxycytidine

kinase) wurde im Magenkarzinom als überexprimiert beschrieben. Gene der ADAMTS-Familie sind in die Angiogenese von Tumoren verwickelt (Vauhkonen et al. 2006).

Tabelle 1: Zugewinne im Bereich 4q13.3 (Sun et al. 2008; Vauhkonen et al. 2006)

Gewebe	Genort	n	Mögliches Zielgen
<b>HCC/Osteopontin (OPN) +</b> (Sun et al. 2008)	4q13.1.-13.3	2/29	EPHA5 (EPH receptor A5)
			UBE1L2 (ubiquitin-activating enzyme E1-like 2)
			UGT2B28 (UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17)
			SMR3B (submaxillary gland androgen regulated protein 3 homolog B)
			MUC7 (mucin 7, secreted)
<b>Magenkarzinom</b> (Vauhkonen et al. 2006)	4q13.3	1/15	ADAMTS3 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 3)
			ANKRD17 (ankyrin repeat domain 17)
			CXCL family (Chemokin-Familie)
			DCK (deoxycytidine kinase)

Sun et al. beschreiben eine Amplifikation im Bereich 4q13.3 in 2 von 71 Tumorproben. Es wurden Osteopontin-positive (OPN+, n=29) und Osteopontin-negative (OPN-, n=42) hepatozelluläre Karzinome (HCC) untersucht. Im Speziellen zeigte sich eine 4q13.3-Amplifikation in 2 der 29 OPN+-Proben. Mikrodeletionen in diesem Bereich zeigten sich in OPN+ und OPN- Zellen. OPN+ Tumore zeigten in drei Regionen eine High-level-Amplifikation, eine hiervon ist ein 5,76 Mb grosses Amplikon im 4q13.1-3-Bereich. Gene innerhalb dieses Amplikone waren EPHA5, UBE\_L2, UGT2B28, UGT2B\_o, NYD-SP26, SMR3B und MUC7 (Sun et al. 2008).

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die erwähnten Amplifikationen. Abbildung 8 zeigt die eben beschriebenen Amplifikationen an ihrem zugehörigen Genort mit ihren potentiellen Zielgenen im Vergleich zu dem von uns gefundenen Amplikon. Es zeigt sich, dass alleinig mit dem Amplikon von Vauhkonen et al. ein sich überlappender Bereich (ANKRD17 bis CXCL2) ergibt.

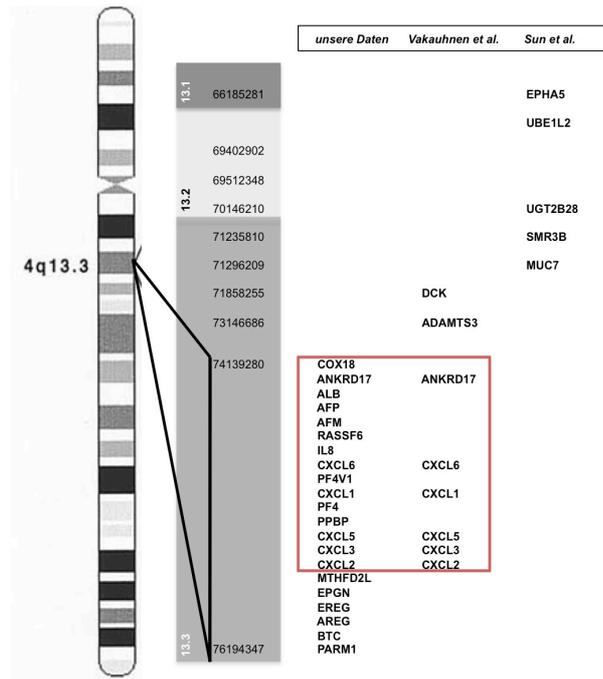


Abbildung 8: **Das 4q13.3-Amplikon.** Die linke Spalte zeigt die überlappenden 21 Gene aus dem von uns gefundenen Amplikon. Vergleichend hierzu sind die Ergebnisse von *Vaukhonen et al.* und *Sun et al.* mit den vermuteten Zielgenen (siehe Text) aufgeführt. Allein mit dem Amplikon von *Vaukhonen et al.* ergibt sich ein überlappender Bereich (rote Box).

### 1.4.3 Das 4q13.3-Amplikon: Auswahl der Sonde

Die 21 im Amplikon enthaltenen Gene wurden bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> recherchiert und nach ihrem Potential als Onkogen hin eingehend betrachtet. Im Amplikon sind mehrere Gene enthalten, welche für Wachstum und Zell-Zellkommunikation mitverantwortlich sind. Die Tabellen 2-4 geben eine der Funktion nach geordnete (nicht nach Reihenfolge geordnete) Übersicht dieser Gene.

Die 7 erst aufgeführten Gene (ANKRD17, ALB, AFP, AFM, RASSF6, COX18, MTHFD2L) haben sich als unwahrscheinliche onkogene Kandidaten herauskristallisiert. Sie haben eine Transport- (Mizejewski 2001), enzymatische (Bolusani et al. 2010; Sacconi et al. 2005) oder Tumorsuppressor-Funktion (Allen et al. 2007) - (siehe Tabelle 2).

Die überbleibende 14 Kandidaten könnten eine onkogene Funktion innehaben. Hierbei fällt PARM1 aus der Rolle und wurde nicht beachtet, da es als Prostata-spezifisch erachtet wird (Fladeby et al. 2008) und somit nicht zu unseren Amplikon-Ursprungsorganen (Ösophagus und Harnblase) passt.

Tabelle 2: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, Teil 1.

Gen	Alternative Bezeichnung	Bedeutung, Funktion
<b>Proteine (Transport, Leberentwicklung)</b>		
<b>ANKRD17</b>	ankyrin repeat domain-containing protein 17, gtar	Leberentwicklung, Protein-Protein-Interaktion (Watt et al. 2001)
<b>albuminoid gene family (Mizejewski 2001)</b>		
<b>ALB</b>	Albumin, serum albumin	Wichtiges Serum-Protein, Transport (Mizejewski 2001)
<b>AFP</b>	alpha-1-fetoprotein	Wird in der fetalen Leber und im Dottersack gebildet. Hepatische Entwicklung, Tumormarker, Gegenstück zu Albumin in der Fetalzeit. Bedeutung in der Tumorgenese noch unklar, Hinweise auf Förderung und Hemmung des Tumorwachstums (Evdokimova and Butterfield 2008)
<b>AFM</b>	Afamin alpha-albumin	event. Transportprotein wie Albumin, z.B. für Vitamin E (Jerkovic et al. 2005)
<b>Andere</b>		
<b>RASSF6</b>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	Mitglied der RAS-Tumorsuppressorgene (Allen et al. 2007)
<b>COX18</b>	Cytochrome c oxidase assembly protein 18 mitochondrial COX18 mitochondrial inner membrane protein COX1	Innere Mitochondrienmembran Atmungskettenbestandteil, notwendig für CytochromC-Oxidase, spielt eine Rolle im Export von COX2 (Sacconi et al. 2005)
<b>MTHFD2L</b>	NADP-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2-like protein	Enzym, gehört zur Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase- Familie (Bolusani et al. 2010)
<b>PARM1</b>	Prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	Proliferative Wirkung im Prostatakarzinom (Fladeby et al. 2008)

Weiterhin fällt die grosse Gruppe der Chemokine auf (siehe Tabelle 3). Bei den 9 Vertretern (CXCL1-CXCL8, teilweise mit unterschiedlichen Bezeichnungen, beispielsweise IL8=CXCL8) handelt es sich meist um Liganden des CXCR2-Rezeptors. Die meisten Vertreter stimulieren die Angiogenese, spielen eine Rolle in der Chemotaxis (z.B. Neutrophilenaktivierung) und werden als autokrine Wachstumsfaktoren angesehen (Vandercappellen et al. 2008). Im Kolonkarzinom konnte für einige Vertreter eine onkogene Rolle nachgewiesen werden (Doll et al. 2010). Zu beachten ist, dass nicht allen Vertretern eine wachstumsstimulierende Funktion nachgesagt wird. Beispielsweise ist für CXCL4 (PF4) und PF4V1, einer Variante des CXCL4s, bekannt, dass sie die Angiogenese und das Tumorwachstum eher hemmen als fördern (Vandercappellen et al. 2008, 2010).

Der zweiten, grossen potentiell onkogenen Gruppe gehören vier der - neben TGF- $\alpha$  - wichtigsten Liganden von ErbB-Wachstumsrezeptoren: Epigen (EPGN), Epiregulin (EREG), Amphiregulin (AREG), sowie Betacellulin (BTC) (siehe Tabelle 4).

Die ErbB-Familie der Tyrosinkinase-Wachstumsrezeptoren besteht auf vier verschiedenen Rezeptorentypen: EGFR/HER1 (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4). Wachstumsfaktoren binden an die extrazelluläre Domäne und aktivieren eine intrazelluläre Signalkaskade. Diese Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und im Wachstum einer Zelle (Lee 2003).

Tabelle 3: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, **Teil 2: die Chemokin-Familie.**

Gen	Alternative Bezeichnung	Bedeutung, Funktion
<b>CXCL1</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 GRO1 oncogene (melanoma growth-stimulating activity)	CXCR2-Liganden, Chemotaxis: Neutrophilenaktivierung Bedeutung in der Angiogenese und Tumorwachstum, eventuell: autokriner Wachstumsfaktor (Vandercappellen et al. 2008)
<b>CXCL2</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	onkogene Bedeutung im Kolonkarzinom (Doll et al. 2010)
<b>CXCL3</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	
<b>PF4 (CXCL4)</b>	platelet factor 4 chemokine (C-X-C motif) ligand 4	Inhibiert Angiogenese und Tumorwachstum (Vandercappellen et al. 2010)
<b>PF4V1</b>	PF4V1 platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var)	Inhibiert Angiogenese und Tumorwachstum (Vandercappellen et al. 2010)
<b>CXCL5</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 5 ENA-78 (epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide)	CXCR2-Ligand, Bedeutung im Magenkarzinom, Angiogenese im Bronchialkarzinom (Vandercappellen et al. 2008)
<b>CXCL6</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 GCP-2: (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCR1- und CXCR2-Ligand, Neutrophilenaktivierung, Angiogenese, Bedeutung im Bronchialkarzinom in der autokrinen Aktivierung (Vandercappellen et al. 2008)
<b>PPBP (CXCL7)</b>	Beta-Thromboglobulin (TGB1) pro-platelet basic protein chemokine (C-X-C motif) ligand 7 NAP2 (Neutrophil-activating peptide-2)	Chemotaxis, Neutrophilenaktivierung, ähnlich der anderen CXCR2-Liganden (Vandercappellen et al. 2008)
<b>IL8 (CXCL8)</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 8 T cell chemotactic factor	CXCR1- und CXCR2-Ligand, Bedeutung in Pankreaskarzinomzellen und im Melanom (Vandercappellen et al. 2008) Stimuliert Angiogenese und Tumorgenese (Vandercappellen et al. 2008; Xie 2001) Bedeutung im Kolonkarzinom (Doll et al. 2010)

Jeder Ligand hat verschiedene, spezifische Bindungsaffinitäten zu den einzelnen ErbB-Rezeptoren. AREG bindet spezifisch an EGFR/ErbB1, EREG und BTC binden zusätzlich an ErbB4 (Hynes and Lane 2005).

Epigen (EPGN) besitzt eine wachstumsstimulierende Wirkung auf epitheliale Zellen (Strachan et al. 2001), was auch Grundlage für seine Namensgebung darstellt (epithelial mitogen). Epigen ist im Urothelkarzinom als überexprimiert beschrieben (Amsellem-Ouazana et al. 2006).

Betacellulin (BTC) wird eine Bedeutung in der Brustentwicklung und im Pankreaskarzinom zugeschrieben (Dunbar and Goddard 2000; Harris et al. 2003). Weiterhin wird es im Mammakarzinom überexprimiert (Revillion et al. 2008).

Tabelle 4: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, **Teil 3: die Wachstumsrezeptorliganden.**

Gen	Alternative Bezeichnung	Bedeutung, Funktion
<b>EPGN</b>	Epigen ( <i>for epithelial mitogen</i> )	Wachstumsfaktor, stimuliert Wachstum epithelialer Zellen (Strachan et al. 2001) Überexprimiert im Urothelkarzinom (Amsellem-Ouazana et al. 2006)
<b>EREG</b>	Epiregulin	Wachstumsfaktor für Keratinozyten (Shirakata et al. 2000) Mitverantwortlich für Metastasierung und Gefäßinvasion in humanen Mammakarzinomzelllinien (Gupta et al. 2007) Assoziiert mit einer schlechteren Prognose im Kolorektalen Karzinom (Li et al. 2010a) Überexpression im Mammakarzinom (McIntyre et al. 2010; Revillion et al. 2008) Bedeutung in der Entstehung des Kolorektalen Karzinoms (Nishimura et al. 2008)
<b>AREG</b>	SDGF (schwannoma-derived growth factor) Amphiregulin	Rolle in der Nervregenerierung, Knochenbildung, Brustentwicklung (Willmarth and Ethier 2008) Als potentielles Ziel in der Therapie des Mammakarzinoms vorgeschlagen (Willmarth and Ethier 2008) Überexprimiert im Urothelkarzinom (Amsellem-Ouazana et al. 2006) Fördert Tumorwachstum von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Oropharynx (Tsai et al. 2006) Rolle in der Brustentwicklung, Mammakarzinom (Bieche et al. 2003; LaMarca and Rosen 2007; McBryan et al. 2008; Revillion et al. 2008; Willmarth and Ethier 2008) Überexpression im Östrogenrezeptorpositivem Mammakarzinom (Ciarloni et al. 2007) Expression assoziiert mit einem besseren Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie (Yonesaka et al. 2008) Assoziiert mit der Entstehung von HCC (Berasain et al. 2007) Östrogen-Rezeptor abhängige Überproduktion von AREG assoziiert mit geringerem Ansprechen auf Aromatase-Hemmer in Mammakarzinomzelllinien (Wang et al. 2008) Assoziiert mit Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor im Mammakarzinom (Revillion et al. 2008) Prognoseparameter im Mammakarzinom (McBryan et al. 2008) Bedeutung in der Entstehung des Kolorektalen Karzinoms (Nishimura et al. 2008) Assoziiert mit einer schlechteren Prognose im Kolorektalen Karzinom (Li et al. 2010a) Assoziiert mit Lebermetastasierung im Kolorektalen Karzinom (Yamada et al. 2008)
<b>BTC</b>	Betacellulin	Vorwiegend in Pankreas-, Leber, Nieren- und Darmgewebe exprimiert (Harris et al. 2003) Bedeutung im Pankreaskarzinom, sowie Brustentwicklung (Dunbar and Goddard 2000; Harris et al. 2003) Überexpression im Mammakarzinom (Revillion et al. 2008)

Die Literaturrecherche ergab keinen Hinweis, dass EREG-, bzw. AREG-Amplifikationen bereits untersucht, bzw. entdeckt wurden. Jedoch besteht eine breite Literaturlauswahl an Studien mit Expressionsanalysen, meist immunhistochemischer Art.

EREG inhibiert das Wachstum einiger epithelialer Tumorzelllinien, kann aber auch das Wachstum von Hepatozyten, Magenzellen und Endothelzellen stimulieren (Alroy and Yarden 1997; Toyoda et al. 1995). Weiterhin fungiert es als autokriner Wachstumsfaktor für Keratinozyten (Shirakata et al. 2000). *Gupta et al.* entdeckten die Verwicklung von EREG in Kombination mit Metalloproteinasen und COX2 in der Lungenmetastasierung, sowie in der Gefäßinvasion von Tumoren (Gupta et al. 2007).

Eine Überexpression von AREG- und EREG wurde für das Urothelkarzinom (Amsellem-Ouazana et al. 2006; Thogersen et al. 2001; Toyoda et al. 1997), das Kolonkarzinom (Li et al. 2010a; Nishimura et al. 2008; Salomon et al. 1995; Yotsumoto et al. 2008), das

Pankreaskarzinom (Ebert et al. 1994; Yotsumoto et al. 2008; Zhu et al. 2000), das Mundbodenkarzinom (Shigeishi et al. 2008; Tsai et al. 2006), das Bronchialkarzinom (Fontanini et al. 1998; Salomon et al. 1995; Toyoda et al. 1997), das Endometriumkarzinom (Ejskjaer et al. 2007), sowie für das Mammakarzinom (McIntyre et al. 2010; Revillion et al. 2008; Salomon et al. 1995) beschrieben.

Eine alleinige Überexpression von AREG ist im Prostatakarzinom (Bostwick et al. 2004; Yotsumoto et al. 2008), im Ovarialkarzinom (D'Antonio et al. 2002), in der Psoriasis (Schneider and Wolf 2009), sowie in der Leberzirrhose und im hepatozellulären Karzinom (Berasain et al. 2007) bekannt.

Auch in verschiedenen Tumorzelllinien zeigt sich häufig eine Überexpression von EREG und AREG (Salomon et al. 1995; Toyoda et al. 1997; Yotsumoto et al. 2008; Zhu et al. 2000).

AREG und EREG zeigen im Kolonkarzinom eine signifikante Assoziation zu einer schlechteren Prognose, Metastasierung (Yamada et al. 2008), Tumoreindringtiefe und einer Nervenscheideninfiltration (nur AREG) (Li et al. 2010a).

Im Mammakarzinom wurde ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Östrogenrezeptor-positiven Zellen und einer AREG-Expression beobachtet (Ciarloni et al. 2007; Revillion et al. 2008). *Wang et al.* vermuten eine Östrogenrezeptor-abhängige Expression von AREG bei Mammakarzinomzelllinien mit einem geringem Ansprechen auf einen Aromatasehemmer (Wang et al. 2008). Die Studienlage ist noch nicht eindeutig, da andere Studien in der Progression des Mammakarzinoms eher TGF- $\alpha$  eine bedeutendere Rolle zukommen lassen als AREG (LaMarca and Rosen 2007; Yonesaka et al. 2008).

Eine hohe Expression von AREG wurde mit einem vermehrten Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom in Verbindung gebracht (Yonesaka et al. 2008).

Die Wahl fiel schlussendlich auf AREG (Amphiregulin) und EREG (Epiregulin), weil es nahe liegt, Liganden eines bereits bekannten, amplifizierten Rezeptors, wie dem EGF-Rezeptor im Ösophaguskarzinom (Rygiel et al. 2008), als weitere Onkogene zu postulieren. Weiterhin konnte für die herzustellende Sone bei imaGenes ([www.imagenes-bio.de](http://www.imagenes-bio.de)) ein pBACe.36-Klon bestellt werden, welcher praktischerweise beide Gene vollständig abdeckt.

## 1.5 FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)

Die sensitivste und spezifischste Methode zur Bestimmung der Genkopiezahl in Tumorzellen ist die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH), welche erstmals 1980 beschrieben wurde (Bauman et al. 1980). Im Gegensatz zur (a)CGH kann mit der FISH kein unbekanntes Amplikon entdeckt werden. Für die FISH Analyse muss eine DNA-Sonde mit bekannter DNA Sequenz hergestellt werden. Diese wird spezifisch für ein bestimmtes Gen ausgewählt.

Die FISH Analyse kann in-situ, das heisst direkt im histologischen Schnittpräparat durchgeführt werden. Die Genkopiezahl wird so in jedem Zellkern einzeln bestimmt. Eine eventuelle Heterogenität der Kopienzahl in verschiedenen Tumorzellen, oder aber die Anwesenheit von normalen Zellen (z.B. Lymphozyten oder Fibroblasten) wird daher sicher erkannt.

Eine markierte, spezifisch für den zu untersuchenden chromosomalen Ort hergestellte (DNA-) Sonde wird auf die zu untersuchenden Zellkerne hybridisiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Die FISH-Analyse ermöglicht die Bestimmung der Kopienzahl und lässt somit Aussagen über Deletionen und Zugewinne, bzw. Amplifikationen bestimmter Sequenzen zu. Die Auflösung der FISH wird durch die Größe der eingesetzten DNA-Sonde bestimmt. In der vorliegenden Untersuchung wurden DNA-Sequenzen genutzt, die 150 Kilobasen (Gensonde) bis mehrere Megabasen (Zentromersonde) umfassen.

## 1.6 Aufgabenstellung

In jeweils einem Ösophagus- und einem Blasenkarzinom wurde eine weitgehend überlappende, kurzstreckige und hochgradige 4q13.3-Amplifikation entdeckt. Der überlappende Bereich wies nur 21 Gene auf. Wir postulieren, dass diese Region ein noch unbekanntes Onkogen enthält. Im besten Fall könnte sich dieses, wie schon beispielsweise das HER2-Gen als Ziel für Medikamente in der Krebstherapie herausstellen.

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, wie häufig das 4q13.3-Amplikon in verschiedenen humanen Tumoren auftritt und welche klinische Relevanz es hat. Zuerst wird das Amplikon mit seinen Genen analysiert, ein potentiell, vielversprechendes Gen ausgesucht und dazu eine Sonde hergestellt (Abbildung 9c). Mittels FISH werden verschiedene Tumorentitäten auf Multitumor-TMAs (Abbildung 9d) auf 4q13.3-Amplifikationen untersucht. Dort gefundene amplifizierte Tumorentitäten werden an einer

grösseren Zahl des definierten Tumortypes weiter analysiert um eventuelle Beziehungen zu Phänotyp und Prognose zu identifizieren.

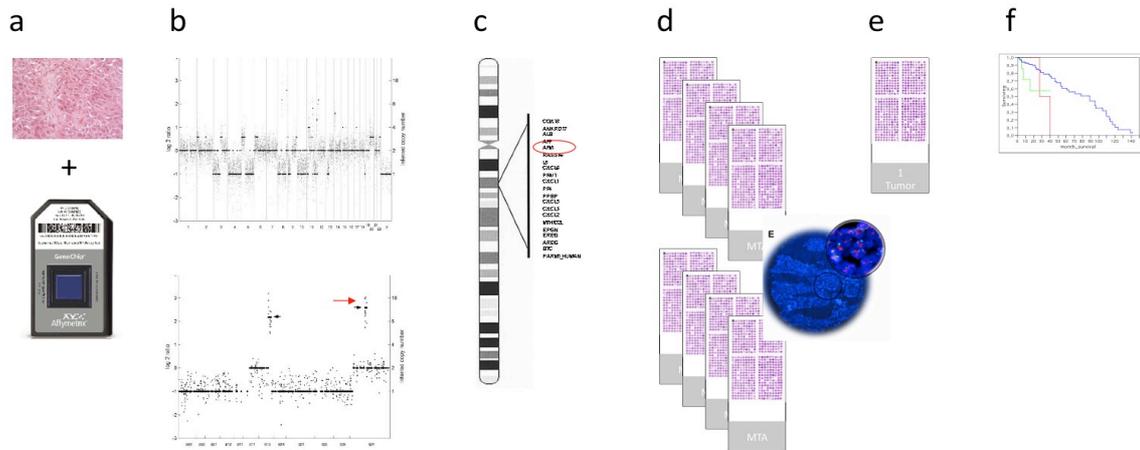


Abbildung 9: **Schritte des Experiments.** a: Tumorgewebe wurde mit dem Affymetrix-Chip analysiert. b: Ergebnisse der CNVs:Darstellung des gesamten Genoms (oben) und eines einzelnen Chromosoms (unten). Identifizierung der Amplikone (roter Pfeil). c: Analyse des Amplikons. Identifizierung der Gene. Auswahl eines geeigneten Gens. Herstellung einer Gen-Sonde (nicht dargestellt). d: FISH-Analyse mittels Gensonde und der passende Zentromersonde von 8 Multitumor-TMAs. e: FISH-Analyse auf einem Single-Tumor-Array. f: Statistische Auswertung, Assoziation zu klinisch-/pathologischen Parametern. Quellen/ modifiziert nach: [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com), (Kononen et al. 1998) und eigene Bildern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Untersuchungsmaterial

#### 2.1.1 Multitumor-TMA

Dieser Gewebe-Mikroarray-Format (Tissue Microarray, TMA) besteht aus 4034 Tumor-, Tumorvorstufen- und 626 Kontrollgeweben, welche auf 8 Objektträgern (A-H) verteilt, gestanzt wurden. Das Gewebe wurde in 4%iger-Formalinlösung fixiert, und anschließend in Paraffin eingebettet. In den Abbildungen 10 und 11 werden die Herstellung und der Aufbau eines TMAs gezeigt.

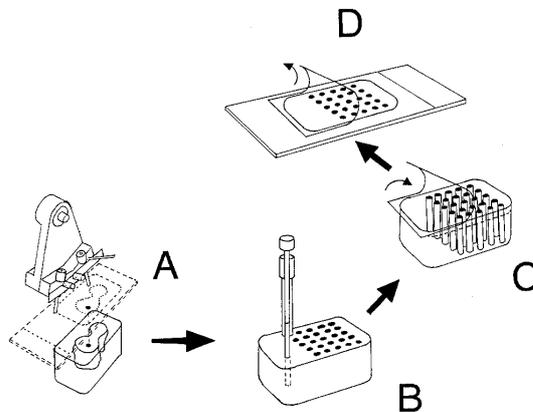


Abbildung 10: **Konstruktion eines Tissue Microarrays (TMAs). a + b.** Mit Hilfe eines speziellen Gerätes (Arrayer) werden mit einer Hohnadel Gewebezylinder (0,6 mm Durchmesser) aus einem Gewebeblock (Routine-Diagnosematerial der Pathologie) entfernt. **c.** Der gestanzte Zylinder wird in einen präformierten, gelöcherten Paraffinblock eingebracht. **d.** Der fertige TMA-Block mit >500 Gewebestücken von verschiedenen Patienten wird mit Hilfe eines speziellen Tapes auf einen Objektträger fixiert und steht zur Auswertung bereit. Quelle: (Bubendorf et al. 2001)

Neben den histologischen Tumorstadien wurden keine weiteren klinisch-pathologischen Daten erhoben. Die Schnitte aller Tumoren wurden von Pathologen bezüglich ihres histologischen Tumorstadiums beurteilt. Tabelle 5 gibt eine Übersicht der einzelnen Tumortypen des Multitumor-TMAs.

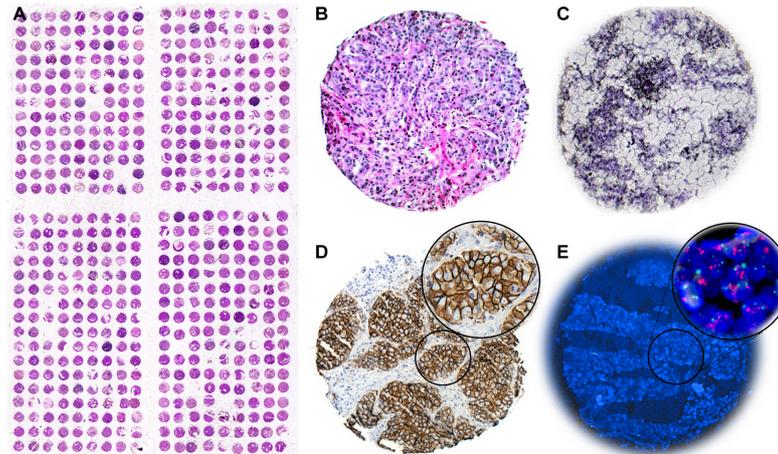


Abbildung 11: **Tissue Microarray (TMA)**. Am TMA können genau dieselben Analysen durchgeführt werden wie an konventionellen Grossschnitten. **a.** HE-gefärbter (HE: Hämatoxylin-Eosin) Schnitt eines TMA, ca 3cm \* 4 cm. **b.** Vergrößerung eines Gewebespots. Originalgrösse: 0,6 mm Durchmesser. Beispiele für molekulare Analysen an TMA-Spots: **c.** RNA-in-situ Hybridisierung, **d.** Immunhistochemie, **e.** FISH-Analyse. Quelle: (Kononen et al. 1998)

### 2.1.2 Ösophagus-Prognose-Tissue Microarray

Für die vorliegende Studie wurden Gewebeproben von 560 Ösophagustumoren in einem Tissue Microarray (TMA) untersucht. Im Detail handelt es sich um 299 primäre Ösophaguskarzinome, 146 Lymphknotenmetastasen und 47 Fernmetastasen. Die restlichen 68 Spots werden von Kontrollgeweben gebildet. Diese bestehen aus 40 anderen Tumoren, 10 gesunden Ösophagusschleimhäuten und 18 gesunden Geweben aus anderen Organen (Quelle: Institut für Pathologie des UKEs, Hamburg). Die Gewebeproben der 299 primären Ösophaguskarzinomen stammen aus Operationsmaterial bei Ösophagusektomien der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des UKEs Hamburgs in den Jahren 1992-2004. Ein einzelner Patient erhielt lediglich eine Mukosektomie. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 62 Jahren (34-92 Jahre). Die Überlebensdaten by follow-up wurden von der Klinik selbst aufgenommen. Die durchschnittliche follow-up Zeitspanne betrug 23,15 Monate (range 1-142 Monate).

Tabelle 5: **Multitumor-TMA (A-H):** 99 Tumortypen und Subtypen: n=4034, Kontrollen: n=626 (Quelle: Institut für Pathologie des UKEs, Hamburg)

Tumortyp (Slide A)	n	Tumortyp (Slide B)	n	Tumortyp (Slide C)	n	Tumortyp (Slide D)	n
Nicht-Seminom	45	Anus, Plattenepithelkarzinom	17	Astrozytom	49	Basaliom	67
Seminom	92	Kolon-Adenom, hochgradige Dysplasie	40	Ependymom	10	Benigner Naevus	59
Niere, chromophobes Karzinom	56	Kolon-Adenom, geringgradige Dysplasie	56	Larynx, Plattenepithelkarzinom	57	Haut, Plattenepithelkarzinom	51
Niere, klarzelliges Karzinom	69	Kolon, Adenokarzinom	60	Medulloblastom	4	Malignes Melanom	48
Niere, papilläres Karzinom	31	Dünndarmkarzinom	22	Mundboden, Plattenepithelkarzinom	54	Merkelzellkarzinom	5
Nierenzellumore, andere	9	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	55	Neuroblastom	51	Nebenniere, Adenom	72
Onkozytom	62	Karzinoid	40	Oligodendrogliom	28	Nebenniere, Karzinom	8
Penis, Plattenepithelkarzinom	36	Magen, diffuses Adenokarzinom	56	Schilddrüse, Adenom	65	Paragangliom	53
Prostata, Adenokarzinom	63	Magen, intestinales Adenokarzinom	62	Schilddrüse, anaplastisches Karzinom	3	Phäochromozytom	64
Teratom	61	Ösophagus, Adenokarzinom	60	Schilddrüse, follikuläres Karzinom	47	Pilomatrixom	48
Kontrollen	71	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	60	Schilddrüse, medulläres Karzinom	31	Harnblase, Urothelkarzinom, (T <sub>a</sub> )	62
		Kontrollen	71	Schilddrüse, papilläres Karzinom	54	Harnblase, Urothelkarzinom, (T <sub>2-4</sub> )	60
				Thymom	57	Harnblase, andere	11
				Lymphoepitheliales Karzinom	5	Kontrollen	71
				Kontrollen	83		
Tumortyp (Slide E)	n	Tumortyp (Slide F)	n	Tumortyp (Slide G)	n	Tumortyp (Slide H)	n
Gallenblase, Adenokarzinom	30	Angiosarkom	7	Ovar, serös-papilläres Zystadenokarzinom	63	Mamma, invasiv duktales Karzinom	62
Lunge, Großzelliges Karzinom	48	Basalzelladenom	37	Ovar, muzinöses Zystadenokarzinom	45	Mamma, invasiv lobuläres Karzinom	65
Lunge, Kleinzelliges Karzinom	15	Chondrosarkom	5	Ovar, Brennertumor	45	Mamma, muzinöses Karzinom	61
Lunge, Adenokarzinom	71	Dermatofibrosarkom protuberans	5	Ovar, endometrioides Karzinom	22	Mamma, medulläres Karzinom	54
Lunge, Plattenepithelkarzinom	59	Desmoid Tumor	9	Zervix, Plattenepithelkarzinom	46	Mamma, tubulär invasives Karzinom	60
Lunge, Bronchoalveoläres Karzinom	15	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	46	Zervix, Adenokarzinom	48	Mamma, Phylloidotumor	48
Mesotheliom	28	Granularzelltumor	8	Zervix, adenosquamoses Karzinom	3	Mammakarzinom, andere	26
Pankreas, papilläres Adenokarzinom	29	Hämangioperizyotom	7	Endometrium, endometrioides Adenokarzinom	60	Mamma, apokrines Karzinom	17
Pankreas, duktales Adenokarzinom	56	Leiomyom	27	Endometrium, seröses Adenokarzinom	58	Stromasarkom	12
Pankreas, neuroendokrines Karzinom	20	Leiomyosarkom	28	Vulva, Plattenepithelkarzinom	61	Karzinoid	38
Riesenzelltumor	40	Liposarkom	16	Vagina, Plattenepithelkarzinom	22	Kontrollen	56
Hodgkin Lymphom	43	Malignes fibröses Histiozytom	25	Kontrollen	108		
Non-Hodkin Lymphom	19	Mukoepidermoid-Karzinom	46				
Kontrollen	99	Neurofibrom	60				
		Pleomorphes Adenom der Parotis	73				
		Warthin Tumor	57				
		Malignes Schwannom	14				
		Kontrollen	67				

Die Daten zum pathologischen Stadium, zu dem histologischen Differenzierungsgrad und zu den Lymphknoten-, bzw. zu den Fernmetastasen wurden von den Befundberichten des Instituts für Pathologie am UKE Hamburg übernommen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 6: **Ösophagus-TMA 1.1.-1.** (Quelle: Institut für Pathologie des UKEs, Hamburg)

Alle Gewebeproben			n=560
Ösophaguskarzinome	Histologie	Adenokarzinom	130
		Plattenepithelkarzinom	163
		Adenosquamöses Karzinom	6
	Tumorstadium	pT1	47
		pT2	85
		pT3	150
		pT4	15
	Nodalstatus	pN0	103
		pN1	195
	Metastasenstatus	pM0	244
		pM1	54
	Histologischer Differenzierungsgrad	G1	5
		G2	166
G3		126	
	Verfügbare Überlebensdaten		294
Lymphknotenmetastasen			146
Fernmetastasen			47
Kontrollen			68

## 2.2 Methoden

Die aufgeführte methodische Vorgehensweise ist den entsprechenden Laborprotokollen entnommen.

### 2.2.1 Kultivierung von pBAC E.coli Klonen

#### Verwendete Materialien

##### *pBAC-E. coli Klon*

RZPD Produkt Nummer: RP11-1727M10 (RZPD B737F0521676D)

Kulturmedium : Luria-Broth-Base (25g/l dH<sub>2</sub>O); autoklaviert

Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol absolut)

Schüttelinkubator: *Thermocycler K 15/300*

Schüttelmaschine : *LS 10*

### pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

Es wird an offener Flamme gearbeitet. Es werden 10ml Luria-Broth-Medium in einen 100ml Erlenmeyerkolben gefüllt. Dazugefügt wird 39µl Chloramphenicol (0,1 mg/ml). Anschließend wird das Medium mit 26µl pBAC-E. coli aus dem Glycerol-Stock (150µl Glycerol; autoklaviert in 2ml-Kryoröhrchen mit 850µl E. coli-Kultur zur Lagerung bei -80°C) oder mit einem Abstrich aus dem Stab-Stock angeimpft. Die Kultur wird bei Raumtemperatur und 250rpm im Schüttelinkubator für zwei Tage inkubiert. Nach zwei Tagen wird von dieser Bakteriensuspension ein Aliquot von 26µl in 13ml frisches LB-Medium und 39µl Cloramphenicol-Lösung überführt. Darauf folgt wiederum die gleiche, zweitägige Schüttelinkubation.

### **2.2.2 pBAC-DNA-Extraktion aus E.coli-Flüssigkultur**

#### Verwendete Materialien

QIAprep Spin Miniprep KIT 250 (Qiagen)

**P1:** 20ml P1 + 200RNase A + Lysa blau, bei 4°C

**P2:** N3 (enthält Natriumacetat), PE (ethanolhaltig, 70%) und EB (Elution Buffer: 10mM, Tris-Cl, pH8,5, enthält 15% Isopropanol)

„QIAprep Spin“-Säulen

Zentrifuge, Thermomixer, NanoDrop (*ND-1000 Spectrophotometer*) mit dem Programm „ND3.1.0: Nucleic Acid“

#### pBAC-DNA-Extraktion

Die Extraktion wird mit einem „*QIAprep Spin MiniKit*“ durchgeführt. Zunächst werden 2ml der hergestellten pBAC-E. coli-Kultur in ein 2ml Eppendorf-Tube pipettiert und für 2 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, so dass ein Bakterienpellet aus 6ml E.coli- Kultur entsteht.

Das entstandene Pellet wird daraufhin in 250µl Resuspensionpuffer P1 + RNase suspendiert. Zufügen von 250µl Lysepuffer P2 und 350µl Neutralisationspuffer N3. Sofortiges Invertieren führt zur Neutralisation der Suspension und renaturiert die Plasmid-DNA. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000rpm. Die Plasmid-DNA verbleibt im Überstand und wird in die „QIAprep spin“-Säule (in einer 2ml Auffang-Eppendorfküvette stehend) pipettiert.

Zentrifugation der Säule (1 Minute bei 13.000rpm). Die Plasmid-DNA bindet in der Säule am Filter. Der Durchfluss in der Küvette wird verworfen.

Die Säule wird durch Zugabe von 500µl PE-Puffer und anschließender Zentrifugation (1 Minute bei 13.000rpm) gewaschen. Zweimalige Wiederholung. Der Durchfluss wird verworfen und die QIAprep-Säule wird nochmals ohne Puffer zentrifugiert. Zur Elution der pBAC-DNA wird die Säule in eine frische 1,5ml Eppendorf-Küvette gestellt und mit 50µl 72°C warmen EB (Elution Buffer) beladen und für 1 Minute inkubiert.

Es folgt eine Zentrifugation bei 13.000rpm für 1 Minute und das Auffangen des Eluats in der Eppendorfküvette. Es wird bei 4°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit erfolgt durch photometrische Messung (DNA-Absorption bei 260nm) am *NanoDrop*. Zur Eichung wird 1,5µl des verwendeten EB- Puffers benutzt. Die DNA-Proben werden nacheinander jeweils mit 1,5µl mittels Photometer gemessen. Die Proben, welche mindestens eine DNA-Konzentration von 50ng/µl haben und eine Reinheitsratio (260/280 Absorptionsverhältnis DNA/Protein) zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen, werden für die DIG-Nick-Translation zur Sondenherstellung genutzt.

### **2.2.3 DIG-Nick-Translation/Sondenmarkierung**

#### Verwendete Materialien

Nick Translations System (*Invitrogen*)

Digoxigenin-11-UTP (1mM) *Roche*

Polymerase I-(10U/µl) (*Invitrogen*)

dNTP-Mix (*Invitrogen*)

pBAC-DNA-Lösung (*selbst hergestellt*)

Thermocycler

DNase Enzym Mix (*Invitrogen*)

0,5U/µl POL I

0,4mU/µl DNase I

Stop-Puffer (0,5M EDTA, pH8,0)

Minishaker IKA (*Janke&Kunkel IKA Labortechnik*)

Vibrofix (*VF1 Electronic*)

## Sondenmarkierung

Die Markierung wurde mit Hilfe des „Nick Translations System“ (Invitrogen) durchgeführt.

Der Gesamtansatz enthält 50µl und wird in ein 0,5ml Eppendorfröhrchen pipettiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: **Ansatz für die Nick-Translation**

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
11-Digoxigenin-dUTP	1µl
pBAC-DNA-Lösung <sup>1</sup>	38µl
Pol I-/DNase Enzym Mix (auf Eis)	5µl
DNA Polymerase I (auf Eis)	1µl
<b>Ansatzmenge</b>	<b>50µl</b>

<sup>1</sup>: abhängig von der Konzentration der DNA-Lösung: benötigte DNA-Menge (2000ng) / verwendetes Volumen (38µl) = **52,6 ng/µl**, daraus folgt: 2000ng / xKonzentration = xµl DNA-Lösung. Eventuell Auffüllen mit dH<sub>2</sub>O, falls <38µl.

Das Gemisch wird gevortext und kurz zentrifugiert. Inkubation bei 15°C für 90 Minuten im Thermocycler. Nach Ablauf der Zeit werden 5µl Polymerasel-DNase-Mix in den Sondenansatz pipettiert und für weitere 15 Minuten bei 15°C im Thermocycler inkubiert. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 5µl Stop-Puffer. Lagerung bei 4°C.

### **2.2.4 FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)**

Die Arbeitsschritte der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) können auf zwei Arbeitstage aufgeteilt werden. Am ersten Tag wird zu untersuchende Präparat auf dem Objektträger entparaffiniert, das Gewebe vorbehandelt und daraufhin die Gen- sowie Zentromersonde zur Hybridisierung aufgebracht. Am zweiten Arbeitstag werden unspezifische Bindungen abgewaschen und die spezifische, hybridisierte Gensonde wird mit Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, detektiert. Danach wird das Chromatin des Gewebes mit DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff) gegengefärbt und das Präparat wird mit dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### Verwendete Materialien

Epifluoreszenzmikroskop Axio Imager.A1 (*Zeiss*)

Objektträger (*Starfrost*)

24x32 mm Deckgläschen (*Marienfeld- Superior*)

Aqua dest.

Ethanol (70%, 80%, 90%) (*Merck*)

Xylol (*Merck*)

VP 2000 Pretreatment Reagent (NaSCN-Natriumthiocyanat, pH5,4) (*Vysis*)

VP 2000 Protease Puffer (0,01N HCl, pH2,0, Pepsin 250mg) (*Vysis*)

Fixogum (*Marabu*)

Hybrite-Thermobrite, Statspin (*Abbot Molecular*)

Wasserbäder Typ 1002, Typ 1083 (*GFL: Gesellschaft für Labortechnik*)

Heizplatten (*MEDAX*)

Küvetten 100ml (*Glaswerk Wertheim*)

COT-DNA (1g/μl) (*Roche*)

selbsthergestellte Sonde (Markierung Spektrum Green)

Zentromersonde CEP4 (Markierung: Spektrum Orange) (*Abbot*)

Selbsthergestellter Basis-Hybridisierungsmix (5,0ml deionisiertes Formamid, 1,0g Dextransulfat und 1,5ml 20\*SSC mit H<sub>2</sub>O auf 7ml aufgefüllt auf 60°C erhitzt, mit 2M HCl auf pH7,0 eingestellt , bei 4°C gelagert)

Flourescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection (*Roche*)

Blocking Solution (Lösung aus niedermolekularen Proteinen)

Anti-DIG monoclonal antibody against digoxigenin mouse IgG1

Anti-Mouse-Ig-DIG-F(ab)<sub>2</sub> fragment from sheep

Antifade-p-Phenylenediamine (*PPD*)

DAPI (0,2mM 4',6-Diamino-2-phenylindol)

Vectashield Mounting Medium for flourescence with DAPI; H-1200 Vector

Brutschrank (*WTB Binder*)

Hybridisierungswaschpuffer

2xSSC (2\* Sodiumcitrat, NaCl)

0,3% NP40 (Octylphenoloxypolyethoxyethanol), pH7,25

PBS (Phosphate buffered saline)

NaCl (Di)

Natriumhydrogenphosphat (*DakoCytomation*)

Detektionswaschpuffer

0,2% TWEEN (Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat) in 1\* PBS in pH7,4

pH-Meter-Digital 525 (*WTW: Wissenschaftliche Technische Werkstätten*)

#### Entparaffinierung, proteolytische Vorbehandlung und Hybridisierung

Die 4µl dicken Gewebeschnitte auf den Objektträgern werden durch dreimaliges Inkubieren in Xylol (10 Minuten) und weiteres zweimaliges Inkubieren in 96% Ethanol (5 Minuten) entparaffiniert. Auf der Heizplatte verdampft das Ethanol für ca. 3 Minuten bei 48°C. Vor der Hybridisierung wird das Gewebe 15 Minuten lang bei 80°C mit der Pretreatment-Lösung inkubiert.

Der Objektträger wird 2 Minuten in dH<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschliessend Inkubation (120-300 Minuten) mit Protease-Lösung bei 37°C. Erneut muss der Objektträger in dH<sub>2</sub>O für 2 Minuten gewaschen werden. Entwässerung in aufeinanderfolgend jeweils 70%, 80% und 96% Ethanol (3 Minuten). Pipettieren der 20µl Sonden-Hybridisierungs-Mix auf den Objektträger.

Tabelle 8: Ansatz für den Sonden-Hybridisierungs-Mix

Basis-Hybridisierungs-Mix	14µl
COT-DNA	2µl
Sonden-DNA <sup>1</sup>	4µl
<b>Ansatzmenge Hybridisierungs-Mix</b>	<b>20µl</b>

<sup>1</sup>: Die Sonden-DNA setzt sich aus 3,5µl selbst hergestellter Sonde und 0,5µl kommerzieller Zentromersonde (CEP4) zusammen.

Der Hybridisierungs-Mix wird nun auf den Objektträger (TMA) aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zur Verhinderung des Austrocknens wird *Fixogum* an den Rändern des Deckgläschens verteilt. Die Objektträger werden vor Licht geschützt, um ein vorzeitiges Ausbleichen zu verhindern. Der Objektträger wird in den *Thermobrite* gelegt. Dort denaturieren die Proteine für 10 Minuten bei 72°C. Anschließend erfolgt die Hybridisierung für 24-72 Stunden bei 37°C.

#### Detektion und Waschen

Der Objektträger (TMA) wird aus dem *Thermobrite* genommen und das *Fixogum* wird zusammen mit dem Deckgläschen entfernt.

Zum Waschen wird der Objektträger für 2 Minuten in den Hybridisierungswaschpuffer bei Raumtemperatur gestellt. Dann wird der TMA in einem frischen

Hybridisierungswaschpuffer gestellt und für 2 Minuten bei 72°C gewaschen, um die nicht-gebundene Sonden-DNA zu entfernen. Der TMA wird 2 Minuten in PBS-Puffer gestellt und danach mit 500µl Blocking Solution eingedeckt.

Nach einer Einwirkdauer von 30 Minuten in einer dunklen Inkubationskammer wird die Blocking Solution abgekippt. Der TMA wird mit dem ersten Detektions-Antikörper für 60-90 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Überschüssiger Antikörper wird mit einer Waschung (Bäder bei 37°C für jeweils 1 Minute) in Detektionswaschpuffer entfernt. Daraufhin werden mit derselben Methode der 2. und 3. Antikörper inkubiert und wiederum abgewaschen, wobei die 3. Waschung in 3 Bädern für jeweils 5 Minuten erfolgt. Die Detektionskaskade mit dem Antikörperbäumchen dient der Signalverstärkung. Die Kaskade bindet an dem Hapten (Digoxigenin) der Gensonde. Nach der dritten Waschung muss der TMA in einer dunklen Kammer lufttrocknen.

Danach wird der Objektträger mit einem Tropfen DAPI/Antifade und einem Deckgläschen eingedeckt. DAPI färbt das Chromatin des Gewebes an. Dadurch wird die Zugehörigkeit eines Gen- oder Zentromersignals zu einem Zellkern bei der Auswertung erkennbar. Antifade verhindert das vorzeitige Ausbleichen der Signale.

### 2.2.5 Auswertung der FISH

Die fertigen TMAs werden mit dem Epifluoreszenzmikroskop *Axio Imager.A1* (Zeiss ®) ausgewertet. Zur Beurteilung der Gensignale wird der grüne FITC Filter genutzt. Die Zentromersignale werden mit dem roten Rhodamin Filter ausgewertet. Die Gen- und Zentromersignale können durch Anfärbung des Zellkerns mit DAPI (blau) und einem entsprechenden DAPI-Filter genau einem Zellkern zugeordnet werden. Dadurch kann die Ratio der Signale in jedem Gewebe bestimmt werden. Die allgemein anerkannten Kriterien (Burandt and Sauter 2010) für die Einstufung der Amplifikationen und geringgradiger Genvermehrungen zeigt Tabelle 9 .

Tabelle 9: FISH: Kriterien

Status	Kriterien
Amp (Amplifikation)	Ratio 4q13.3/CEP4 > 2,0
Geringgradige Genvermehrung	1,0 < Ratio 4q13.3/CEP4 < 2,0
Normal	Ratio 4q13.3/CEP4 = 1,0

### 2.2.6 Statistische Analyse

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, dem histologischen Differenzierungsgrad, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Genamplifikationen

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

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Amplifikationen in humanen Tumoren

Die acht Multitumor-TMAs (A-H) wurden in der Screening-Phase nach hochgradigen (High-Level-) Amplifikationen, das heißt Amplifikationen, die eine Ratio von 4 überschreiten, durchsucht. Andere Kriterien (Spot verloren, Signal zu schwach, geringgradige Genvermehrungen) wurden nicht registriert. Dieses Verfahren wurde gewählt, um schnellst möglich Tumorarten zu identifizieren, in welchen Amplifikationen vorkommen. Erfasst wurde die absolute Zahl der vorgefundenen High-level-Amplifikationen, um falsch positive Ergebnisse möglichst zu vermeiden. Auf eine numerische Auswertung wurde somit verzichtet. Man kann mittels der Daten keine Angaben über die Häufigkeit oder die prozentuale Verteilung in Tumoren machen, da nicht zwischen negativen und nicht auswertbaren Tumoren unterschieden werden kann.

Eine 4q13.3-Amplifikation gemäß der vordefinierten Kriterien (siehe Tabelle 9) wurde bei 30 Proben, welche von 11 verschiedenen Tumorentitäten stammten, gefunden. Dabei zeigten sich in der Regel hochgradige Amplifikationen, welche in Clustern oder extrachromosomal vorlagen.

Amplifikationen fanden sich in einem Kolonkarzinom, in einem Plattenepithelkarzinom des Anus, in einem Plattenepithelkarzinom des Larynx, in 3 Plattenepithelkarzinomen der Lunge, in 2 Ovarialkarzinomen vom serösen Typ, in 2 Endometriumkarzinomen vom serösen Typ, sowie in 8 Mammakarzinomen (medullärer, duktaler und muzinöser Typ).

Besonders häufig wurden 4q13.3-Amplifikationen in Ösophaguskarzinomen gefunden. Amplifikationen zeigten sich in 9 Plattenepithelkarzinome und 3 Adenokarzinome des Ösophagus. Weiterhin zeigte sich ein gehäuftes Auftreten in Plattenepithelkarzinomen unterschiedlicher Organe (Larynx, Anus, Lunge, Ösophagus). 14 der 30 Amplifikationen fanden sich in diesem histologischen Typ. Zusätzlich betrafen 12 Amplifikationen potentiell hormonabhängige Malignome (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Endometriumkarzinom).

Tabelle 10: **4q13.3-Amplifikationen** auf den Multitumor-TMAs

Multitumor-TMA	Tumortyp	n (4q13.3-Amplifikationen)
B	Ösophagus, Adenokarzinom	3
	Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	9
	Kolon, Adenokarzinom	1
	Anus, Plattenepithelkarzinom	1
C	Larynx, Plattenepithelkarzinom	1
E	Lunge, Plattenepithelkarzinom	3
G	Ovar, seröses Adenokarzinom	2
	Endometrium, seröses Adenokarzinom	2
H	Mamma, medulläres Karzinom	2
	Mamma, duktales Karzinom	4
	Mamma, muzinöses Karzinom	2

### 3.2 4q13.3-Amplifikation im Ösophaguskarzinom

Aufgrund der im Ösophaguskarzinom hohen Amplifikationshäufigkeit wurde in der Folge ein Ösophagus-TMA untersucht. Ziel war es zu klären, ob eine Beziehung zwischen einer 4q13.3-Amplifikation und dem Phänotyp oder der Prognose vorliegt. Von den 299 primären Ösophaguskarzinomen des TMAs konnten 222 (74,25%) erfolgreich mittels FISH analysiert werden. Für insgesamt 77 Gewebe konnte der 4q13.3-Amplifikationsstatus nicht bestimmt werden, da entweder die FISH-Signale zu schwach waren (n=70), oder weil der Gewebespot während der Analyse vom TMA abgeschwommen ist (n=7).

Von den 222 analysierbaren Tumoren zeigten 11 (4,95%) eine 4q13.3-Amplifikation. Die Amplifikationen waren mit maximal 6-17 Genkopien relativ hochgradig. Die mittlere Kopienzahl der amplifizierten Tumoren lag bei 9,4 Kopien. Ein Beispiel wird in Abbildung 12 demonstriert. Neun Tumoren (4,05%) zeigten eine geringgradige Genvermehrung mit meist 3-4 Gensignalen.

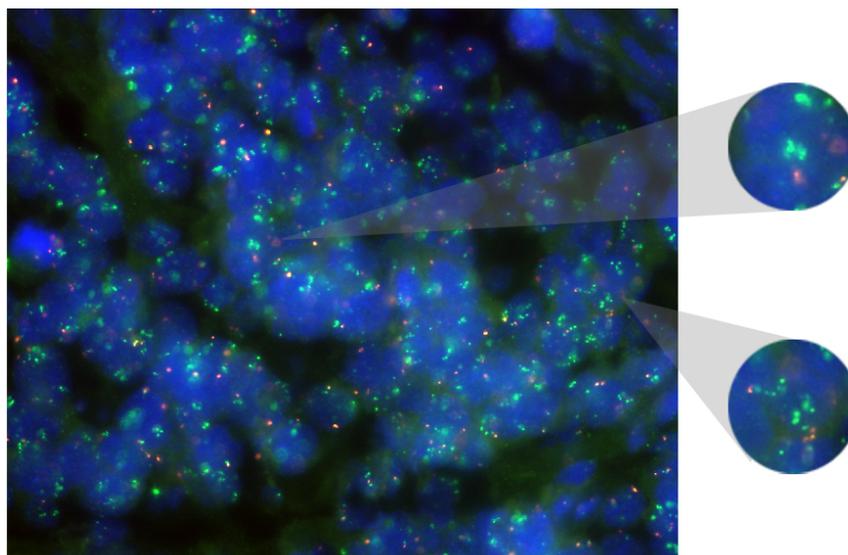


Abbildung 12 : **Amplifikation im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus**: Fotodokumentation Spot A71, Ösophagus-TMA, aufgenommen mit der Axio Cam und dem Epifluoreszenzmikroskop *Axio Imager.A1* (Zeiss®), Vergrößerung: 1:400.

### 3.3 Assoziation zum histologischen Typ

Von den 299 primären Ösophagustumoren konnten 222 analysierbaren Tumoren sind 77 dem Typ Adenokarzinom, 139 dem Typ Plattenepithelkarzinom, und sechs einem anderen histologischen Typ zuzuordnen. Letztere zeigten keine Amplifikation und keine geringgradige Genvermehrung. Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Assoziation zum histologischen Typ ( $p=0,0061$ ): Die 4q13.3-Amplifikationen (11/216: 5,09%) wurden ausschließlich in Plattenepithelkarzinomen gefunden.

In beiden Entitäten zusammen fanden sich 9 geringgradige Genvermehrungen (4,19%). Bezogen auf alle Plattenepithelkarzinome ( $n=139$ ) zeigte sich eine Amplifikationsrate von 7,91% (11/139) und eine geringgradige Genvermehrungsrate von 3,60% (5/139).

Im Adenokarzinom ( $n=77$ ) zeigten sich keine Amplifikationen, lediglich 4 geringgradige Genvermehrungen (4/77: 5,19%).

Tabelle 11: **4q13.3-Amplifikation**, Assoziation zum histologischen Typ im Ösophaguskarzinom

	n	Ratio 4q13.3:CEP 4 [absolut (%)]			p
		Normal (Ratio 1,0)	Geringgradige Genvermehrung (Ratio 1,0<x<2,0)	Amp (Ratio $\geq 2,0$ )	
<b>Alle Tumoren</b>	216 <sup>1</sup>	196 (90,74%)	9 (4,17%)	11 (5,09%)	
<b>Plattenepithelkarzinom</b>	139	123 (88,49%)	5 (3,60%)	11 (7,91%)	<b>0,0061</b>
<b>Adenokarzinom</b>	77	73 (94,81%)	4 (5,19%)	0	

<sup>1</sup>: die 6 Adenosquamösen Karzinome wurden nicht berücksichtigt

### 3.4 Assoziation der 4q13.3-Amplifikation zum Tumorphänotyp

Innerhalb der Gruppe der Plattenepithelkarzinome zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen Amplifikationen oder geringgradigen Genvermehrungen und pT (p=0,6996), pN (p=0,5122), pM (p=0,2309) oder dem histologischen Differenzierungsgrad (p=0,4612).

4q13.3-Amplifikationen traten in etwa gleich häufig in lymphogen metastasierten und nicht metastasierten Tumoren auf. So zeigten 7/80 (8,75%) der pN1 Tumoren und 4/58 (6,90%) der pN0 Tumoren eine 4q13.3-Amplifikation (p=0,5122). Der Zusammenhang ist statistisch nicht signifikant (p=0,5122).

Bezüglich des histologischen Differenzierungsgrades treten keine Amplifikationen in gut differenzierten (G1) Tumoren auf: Keiner der 3 G1-Tumoren, aber 8/94 (8,55%) der G2 Tumoren und 3/41 (7,32%) der G3 Tumoren zeigten eine Amplifikation. Der Zusammenhang ist statistisch nicht signifikant (p=0,4612).

4q13.3-Amplifikationen waren besonders häufig in nicht fernmetastasierten Karzinomen: Keine der 15 pM1-Tumoren weisen eine Amplifikation auf. Die 11 Amplifikationen finden sich alle in pM0-Tumoren wieder (11/123: 8,95%). Jedoch ist auch diese Assoziation statistisch nicht signifikant (p=0,2309).

Tabelle 12: **4q13.3-Amplifikation**, Assoziation zu pT, pN, pM, histologischen Differenzierungsgrad im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

	n	Ratio 4q13.3:CEP 4 [absolut (%)]			p
		Normal (Ratio 1,0)	Geringgradige Genvermehrung (Ratio 1,0<x<2,0)	Amp (Ratio ≥2,0)	
<b>Plattenepithelkarzinome</b>	<b>139</b>	123 (88,49%)	5 (3,60%)	11 (7,91%)	
<b><u>pT</u><sup>1</sup></b>					
<b>pT1</b>	<b>22</b>	19 (86,36%)	1 (4,55%)	2 (9,08%)	0,6996*
<b>pT2</b>	<b>29</b>	26 (89,66%)	0	3 (10,34%)	
<b>pT3</b>	<b>79</b>	70 (88,61%)	4 (5,06%)	5 (6,33%)	
<b>pT4</b>	<b>8</b>	7 (87,50%)	0	1 (12,50%)	
<b><u>pN</u><sup>1</sup></b>					
<b>pN0</b>	<b>58</b>	53 (91,38%)	1 (1,72%)	4 (6,90%)	0,5122*
<b>pN1</b>	<b>80</b>	69 (86,25%)	4 (5,00%)	7 (8,75%)	
<b><u>pM</u><sup>1</sup></b>					
<b>pM0</b>	<b>123</b>	108 (87,80%)	4 (3,25%)	11 (8,95%)	0,2309*
<b>pM1</b>	<b>15</b>	14 (10,07%)	1 (0,72%)	0	
<b><u>Histologischer Differenzierungsgrad</u><sup>1</sup></b>					
<b>G1</b>	<b>3</b>	2 (67,67%)	1 (33,33%)	0	0,4612*
<b>G2</b>	<b>94</b>	83 (88,30%)	3 (3,19%)	8 (8,55%)	
<b>G3</b>	<b>41</b>	37 (90,24%)	1 (2,44%)	3 (7,32%)	

\*: statistisch nicht signifikant, <sup>1</sup> n=138, fehlende Angaben bei 1 Probe

Betrachtet man die Amplifikationen gesondert, ohne die geringgradigen Genvermehrungen zu berücksichtigen, findet sich auch hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Daten nicht aufgeführt).

### 3.5 Prognoserelevanz der 4q13.3-Amplifikation

Mittels Kaplan-Meier-Verfahrens wurde eine Assoziation der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen zum Überleben untersucht. Im Plattenepithelkarzinom konnte keine signifikante Verschlechterung der Überlebensrate bei Tumoren mit Amplifikationen, geringgradigen Genvermehrungen oder normalen Tumoren gezeigt werden ( $p=0,4827$ ).

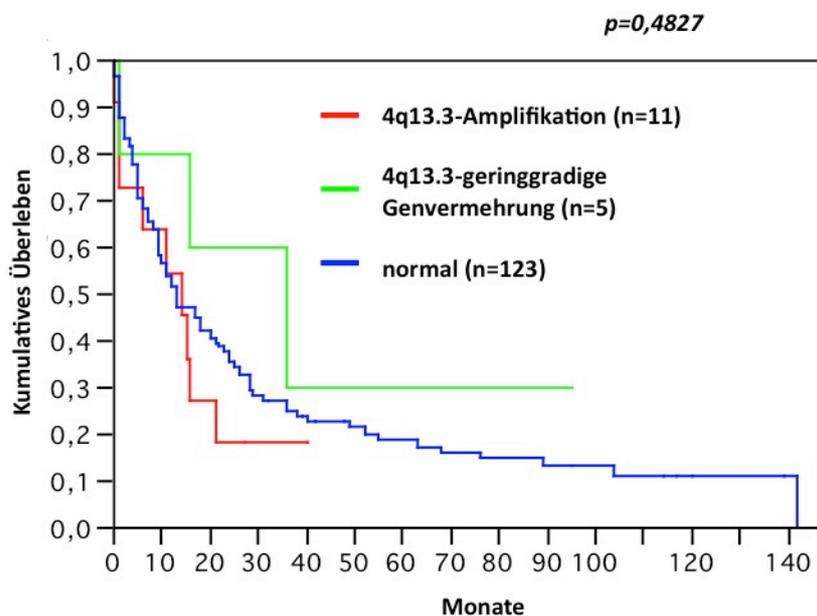
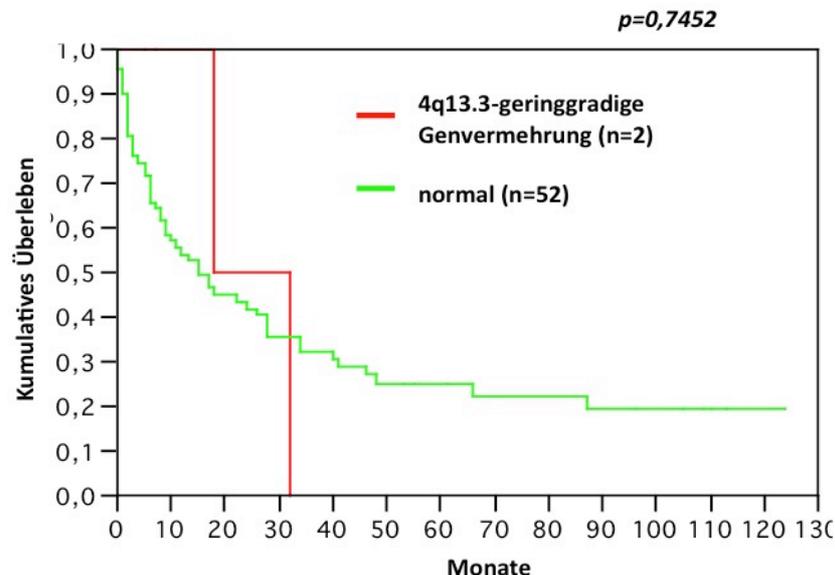


Abbildung 13: **4q13.3 Amplifikationen** und Patientenüberleben beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.  $p=0,4827$

Weiterhin konnte im Adenokarzinom keine signifikante Verschlechterung der Überlebensrate bei Tumoren mit geringgradigen Genvermehrungen oder normalen Tumoren gezeigt werden ( $p=0,7452$ ).

Abbildung 14: **4q13.3-geringgradige Genvermehrungen** und Patientenüberleben beim Adenokarzinom des Ösophagus.  $p=0,7452$



### 3.6 Assoziation mit korrespondierenden Lymphknoten/Fernmetastasen

Die Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der Amplifikationen in den Primärtumoren und, wenn vorhanden, den Status der zugehörigen Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen.

Keine der 11 Amplifikationen oder 5 geringgradigen Genvermehrungen der primären Plattenepithelkarzinome haben eine korrespondierende Fernmetastase auf dem TMA.

Es existieren keine Lymphknotenmetastasen in 6 der 11 (54,54%) Amplifikationsfälle. In 3 der 11 Fälle (27,27%) konnte die vorhandene Lymphknotenmetastase nicht ausgewertet werden, weil der Spot abgelöst war (2 von 11: 18,18%), oder der Spot nicht ausgewertet werden konnte (1 von 11: 9,09%). Die restlichen Amplifikationen (2 von 11: 18,18%) zeigten in ihren korrespondierenden Lymphknotenmetastasen den gleichen Status (amplifiziert) mit vergleichbaren Auszählergebnissen.

Zwei der 5 geringgradigen Genvermehrungen haben keine korrespondierende Lymphknoten-, bzw. Fernmetastase auf dem TMA. Bei 3 der geringgradigen Genvermehrungen konnten bei zwei Primärtumoren die Lymphknoten beurteilt werden. Hier zeigte sich jeweils eine geringgradige Amplifikation. Der Lymphknoten des dritten Falles mit einer geringgradigen Genvermehrung konnte nicht ausgewertet werden.

Tabelle 13: Spots mit einer Amplifikation oder einer geringgradigen Genvermehrung mit den korrespondierenden Lymphknoten- oder Fernmetastasen im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

Nr.	Spot	Status (Kopienzahl 4q13.3/Kopienzahl CEP4) <sup>1</sup>		
		Primärtumor	Lymphknotenmetastase	Fernmetastase
340	A 1a	<b>Amplifikation (6-10/2-5)</b>	-	-
338	A 1d	<b>Amplifikation (6-16/2-4)</b>	-	-
10	A 1i	<b>Amplifikation (4-8/2-3)</b>	-	-
34	A 1p	<b>Amplifikation (4-10/2-4)</b>	-	-
106	A 3e	<b>Amplifikation (5-10/2-4)</b>	-	-
255	A 2b	<b>Amplifikation (6-12/2-6)</b>	-	-
289	A 7l	<b>Amplifikation (6-16/2-4)</b>	-	-
	D 3d		n.t.	
191	A 3g	<b>Amplifikation (8-20/2-8)</b>	-	-
	C 6m		n.t.	
105	A 3d	<b>Amplifikation (6-12/1-2)</b>	-	-
	C 6k		n.s.	
241	A 2i	<b>Amplifikation (6-8/1-2)</b>	-	-
	C 5l		<b>Amplifikation (5-6/2-3)</b>	
222	A 4k	<b>Amplifikation (6-16/2-6)</b>	-	-
	C 8e		<b>Amplifikation (8-12/3-4)</b>	
190	A 3f	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-6/2-4)</b>	-	-
	C 6l		<b>Amplifikation (5-7/2-4)</b>	
113	A 6n	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-6/2-4)</b>	-	-
	D 2a		<b>Amplifikation (4-6/2-3)</b>	
280	A 9r	<b>Geringgradige Genvermehrung (4-8/4)</b>	-	-
	D 7b		n.s.	
96	A8a	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-6/2-4)</b>	-	-
229	A4f	<b>Geringgradige Genvermehrung (3-5/2-4)</b>	-	-
88	A 9k	Norm (2-4/2-4)	-	-
	D 6d		Norm (4-5/4-5)	
	C 3i			<b>Geringgradige Genvermehrung (4/2-3) (Hepar)</b>
133	B 1k	Norm (2-4/2-4)	-	-
	D 7m		n.s.	
	C 4a			<b>Amplifikation (6-9/2-4) (LK cervical/ A. hepatica)</b>

n.t.: no tissue, n.s.: no signal, -: Keine LK/Fernmetastase vorhanden, LK: Lymphknoten

<sup>1</sup>Amplifikation: Ratio  $\geq 2,0$ , geringgradige Genvermehrung: Ratio  $1,0 < x < 2,0$ , Norm: Ratio 1,0

In zwei Primärtumoren, welche als normal klassifiziert wurden, konnte in den korrespondierenden Fernmetastasen eine geringgradige Genvermehrung und eine Amplifikation gefunden werden. Der jeweilige Lymphknoten konnte nicht ausgewertet werden oder zeigte keine Genvermehrung.

Die Spots der Ursprungstumoren (Spots A9k und B1k) wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und überprüft, ob sich in den Spots Normalgewebe oder Tumor befindet. In beiden Spots fanden sich Plattenepithelkarzinomanteile.

Tabelle 14: Spots mit einer Amplifikation oder einer geringgradigen Genvermehrung mit den korrelierenden Lymphknoten oder Fernmetastasen im Adenokarzinom des Ösophagus.

Nr.	Spot	Status (Kopienzahl 4q13.3/Kopienzahl CEP4) <sup>1</sup>		
		Primärtumor	Lymphknotenmetastase	Fernmetastase
70	B 7a D 4e C 2l	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-6/2-4)</b>	<b>Geringgradige Genvermehrung (5-6/3-4)</b>	<b>Geringgradige Genvermehrung (4-6/2-4)</b> (LK Tr. coeliacus)
19	B 4m C 9i	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-4/2)</b>	<b>Amplifikation (6-8/2-4)</b>	-
154	B 9a D 7e	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-3/1-2)</b>	n.s.	-
329	B 9i D 8a C 4c	<b>Geringgradige Genvermehrung (2-4/2)</b>	n.s.	n.s. (Hepar)
5	B 2b C 5e B 9n	Norm (2/2)	<b>Geringgradige Genvermehrung (3-6/2-4)</b>	n.t. (LK Tr. coeliacus)
319	B 5d D 1d C 2a	Norm (2/2)	<b>Geringgradige Genvermehrung (3-4/2-3)</b>	n.t.
216	B 4p C 2c	Norm (2-4/2-4)	-	<b>Geringgradige Genvermehrung (3-4/2-3)</b> (LK Tr. coeliacus)

n.t.: no tissue, n.s.: no signal, -: Keine Lymphknoten-/Fernmetastase vorhanden, LK: Lymphknoten

<sup>1</sup>Amplifikation: Ratio  $\geq 2,0$ , geringgradige Genvermehrung: Ratio  $1,0 < x < 2,0$ , Norm: Ratio 1,0

Bei den Adenokarzinomen waren bei 4 geringgradigen Genvermehrungen jeweils die korrespondierenden Lymphknoten auf dem TMA vorhanden. In zwei Fällen konnte der Spot nicht ausgewertet werden, in den anderen Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine geringgradige Amplifikation und eine geringgradige Genvermehrung. Bei zwei der Fälle war zusätzlich eine Fernmetastase vorhanden. Sie wies das gleiche Muster (geringgradige Genvermehrung) wie der Primärtumor auf oder konnte nicht ausgewertet werden.

In drei als „normal“ eingestuften Primärtumoren konnte bei den Lymphknotenmetastasen ein geringgradige Genvermehrung verzeichnet werden, die Fernmetastasen-Spots waren nicht vorhanden (no tissue) und konnten somit nicht beurteilt werden. Ein „normaler“ Primärtumor zeigte in seiner Fernmetastase eine geringgradige Genvermehrung. Eine zugehörige Lymphknotenmetastase war auf dem TMA nicht vorhanden.

## 4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit war die Identifikation von zwei Tumoren mit einer umschriebenen, hochgradigen 4q13.3-Amplifikation. Es handelt sich dabei um ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und um ein Urothelkarzinom der Harnblase. Insgesamt konnte für die beiden Amplikone ein enger überlappender Bereich registriert werden, welcher insgesamt 21 Gene umfasste. Obwohl die Amplikone in zwei verschiedenen Tumorarten gefunden worden waren, postulierten wir, dass beide Amplifikationen zur Überexpression des gleichen relevanten Zielgens führen könnten. Bisherige Erfahrungen mit Amplifikationszielen in der Tumorbilogie hatten gezeigt, dass die meisten Amplifikationen in verschiedenen Tumorarten vorkommen. Die einzigen, uns bekannten tumorspezifischen Amplifikationen sind die Androgenrezeptoramplifikation beim hormonrefraktären Prostatakarzinom (Bubendorf et al. 1999; Dutt and Gao 2009) und weitestgehend die E2F3-Amplifikation (6p22) beim Urothelkarzinom der Harnblase (Oeggerli et al. 2006). Das Studium der früheren Literatur zu 4q13.3-Amplifikationen ergab nur wenige Hinweise von anderen Arbeitsgruppen. *Sun et al. und Vauhkonen et al.* haben zwei Fälle, bzw. einen Fall von einer 4q13.3-Amplifikation beschrieben, welche zumindest teilweise mit unserem Amplikon zu überlappen scheinen (Sun et al. 2008; Vauhkonen et al. 2006). Die 4q13.3-Amplifikation, welche von *Sun et al.* (Sun et al. 2008) im hepatozellulären Karzinom beschrieben wurde, beinhaltet unsere Amplifikation möglicherweise nicht, so dass unter Umständen tatsächlich mehrere Gene der 4q13.3-Region durch Amplifikation überexprimiert werden können.

Eine umfassende Analyse der bekannten Funktionen der 21 Kandidaten-Gene unseres kleinsten gemeinsamen Amplikons ist in der Einleitung (Seite 22-26) wiedergegeben. Die unmittelbar nebeneinander liegenden Gene Epiregulin (EREG) und Amphiregulin (AREG) erschienen uns am ehesten potentiell tumorrelevant, da sie in mehreren Tumoren überexprimiert beschrieben sind und eine onkogene Funktion als Wachstumsrezeptorliganden innehaben könnten. Für die weitere Untersuchung der Prävalenz von 4q13.3-Amplifikationen wurden deswegen spezifische FISH-Proben für die Region der beiden Gene hergestellt. Zwar hatten bisherige Untersuchungen keine Hinweise darauf ergeben, dass 4q13.3-Amplifikationen bei einem Tumortyp besonders häufig vorkommen, bzw. eine biologische Relevanz haben könnten, noch gibt es viele Beispiele von genomischen Veränderungen, welche nur bei ganz vereinzelt, teilweise auch seltenen Tumoren vorkommen. So beispielsweise die E2F3-Amplifikation beim Urothelkarzinom (Oeggerli et al. 2006) und auch die TMPRSS2-ERG-Fusion beim

Prostatakarzinom (Scheble et al. 2010). Bei der TMPRSS2-ERG-Fusion kommt es bei etwa 40-50% der Prostatakarzinome zu einer Fusion des Transkriptionsfaktors ERG mit dem Androgenrezeptor-abhängigen Gen TMPRSS2, was zu einer kräftigen ERG-Überexpression in Prostatakarzinomzellen führt (Scheble et al. 2010). Umfassende Untersuchungen mittels FISH und Immunhistochemie haben gezeigt, dass die TMPRSS2-ERG-Fusion auf der genomischen Ebene absolut prostatakarzinomspezifisch ist (Scheble et al. 2010) und dass auch die ERG-Überexpression, abgesehen von seltenen Gefäßtumoren und einzelnen Thymomen, nur beim Prostatakarzinom vorkommt (Dr. Minner, UKE Hamburg, persönliche Mitteilung). Auch für 4q13.3-Amplifikationen wäre somit eine hohe Häufigkeit in einem speziellen, bisher nicht untersuchten Tumortyp durchaus denkbar.

Die Klärung der Frage, ob 4q13.3-Amplifikationen bei irgendeinem Tumortyp häufig vorkommen, verlangt grundsätzlich nach einer sehr aufwendigen Studie, welche früher mit vertretbarem Aufwand kaum durchführbar gewesen wäre. Die Tissue Microarray (TMA)-Technik erlaubt es aber relativ einfach derartige Studien durchzuführen. Bei der TMA-Technik werden bis zu 600 verschiedene Tumorgewebeproben mit einem Durchmesser von 0,6 mm auf einem einzigen Objektträger untersucht (Bubendorf et al. 2001; Kononen et al. 1998). Die gleichzeitige Untersuchung sämtlicher Proben unter absolut identischen Bedingungen führt zu einer sehr hohen Standardisierung sämtlicher Untersuchungsverfahren. Für Untersuchungen mit der Frage, bei welchen Tumorarten bestimmte molekulare Veränderungen häufig vorkommen, haben sich in der Vergangenheit Multitumor-TMAs bewährt (Schraml et al. 1999). Bei dieser TMA-Form werden zahlreiche Proben von zahlreichen verschiedenen Tumoren auf ein Set von Tissue Microarrays gebracht. Frühere Untersuchungen mit Multitumor-TMAs haben beispielsweise gezeigt, dass die c-kit-Überexpression auf wenige Tumorarten limitiert ist (Went et al. 2004), dass E2F3-Amplifikationen praktisch nur bei urothelialen Karzinomen vorkommen (Oeggerli et al. 2006) und, wie oben ausgeführt, auf eine hohe Spezifität der TMPRSS2-ERG-Fusion für das Prostatakarzinom hingewiesen (Scheble et al. 2010). Die meisten Untersuchungen an Multitumor-TMAs haben allerdings gezeigt, dass die untersuchten Proteine/Amplifikationen bei vielen verschiedenen Tumorarten vorkommen. Beispiele hierfür sind die Expression von Calretinin, welche in 46 von 128 untersuchten Tumorarten gefunden wurde (Lugli et al. 2003), die Cyclin D1-Amplifikation (6 von 17 untersuchten Tumorarten) (Schraml et al. 1999) oder die MYC-Amplifikationen (8 von 17 untersuchten Tumorarten) (Schraml et al. 1999).

Für die Untersuchung unseres Multitumor-TMA wurde ein vereinfachtes FISH-Analyse-Verfahren verwendet, bei dem lediglich Tumoren mit einer mindestens vierfachen Vermehrung der 4q13.3-Probe im Vergleich zum Zentromer von Chromosom 4 vorlagen. Dieses Verfahren wurde deswegen gewählt, weil alle bisher bekannten relevanten Onkogene in relativ hoher Häufung derart hohe Amplifikationen aufweisen, während geringgradige Genkopienvermehrungen zwar häufig in praktisch allen Tumorarten vorkommen, doch nicht selten längere Strecken mit sehr vielen Genen beinhalten und deswegen als weniger genspezifisch anzusehen sind als hochgradige Amplifikationen (persönliche Mitteilung Prof. Sauter). Tatsächlich zeigen die Daten unserer Multitumor-TMA-Untersuchungen, dass hochgradige 4q13.3-Amplifikationen immer wieder vorkommen. Amplifikationen wurden bei 12 Ösophaguskarzinomen (9 Plattenepithelkarzinome, 3 Adenokarzinome), einem Kolonkarzinom, einem Analkarzinom, einem Plattenepithelkarzinom des Larynx, 3 Plattenepithelkarzinomen der Lunge, 2 serösen Karzinomen des Ovars, 2 serösen Karzinomen des Endometriums, sowie 8 Mammakarzinomen (medullärer, duktaler und muzinöser Typ) gefunden. Auffallend bei diesen Daten ist ein besonders gehäuftes Auftreten von Amplifikationen bei Plattenepithelkarzinomen, Tumoren mit Östrogen-/Progesteron-Rezeptor-Abhängigkeit (Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomen), sowie insbesondere eine hohe Häufung im Ösophaguskarzinom. Die Anzahl der Amplifikationsfälle pro Tumorentität ist mit 1-9 Fällen zwar nicht sehr hoch, doch muss berücksichtigt werden, dass heute viele wichtige, auch therapeutisch relevante molekulare Veränderungen in Tumoren bekannt sind, welche ebenfalls nicht besonders viel häufiger auftreten. Beispielsweise sind nur ca. 17% der Mammakarzinome HER2-positiv (Al-Kuraya et al. 2004) und somit einer Herceptin-Behandlung zugänglich. Auch die für eine Therapie mit Anti-EGFR-Medikamenten bei Bronchialkarzinomen prädisponierende EGFR-Mutation ist nur in ca. 5% der Tumore nachweisbar (Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004; Zhang and Chang 2007). Bemerkenswerterweise fand sich eine 4q13.3-Amplifikation in keinem der untersuchten Urothelkarzinome, obwohl eines unserer Ausgangstumoren ein eindeutiges Urothelkarzinom der Harnblase war. Es ist bekannt, dass viele DNA-Amplifikationen nur selten in Tumoren vorkommen. Logischerweise ist die Chance, ein seltenes Vorkommnis bei zumindest einem Tumortyp auf einem Multitumor-TMA von über 4000 Tumoren zu finden, relativ hoch. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die 4q13.3-Amplifikation bei einer geringen Zahl von untersuchten Urothelkarzinomen (n=20) in unserem mittels SNP-Array untersuchten Kollektiv massiv überrepräsentiert ist.

Auffallend ist die starke Assoziation der 4q13.3-Amplifikation mit dem Vorliegen von plattenepithelialer Tumordifferenzierung, bzw. Östrogen-Rezeptor-Abhängigkeit. Die von

uns aufgrund der initialen Literaturanalyse präferierten Kandidaten-Gene Epiregulin (EREG) und Amphiregulin (AREG) haben keine bekannte Funktion, welche eine besondere Beziehung zur plattenepithelialen Differenzierung vermuten ließe. Jedoch wird für Amphiregulin vermutet, dass es im Rahmen der Brustdrüsenentwicklung als epithelialer Wachstumsfaktor eine Rolle spielt (LaMarca and Rosen 2007). Weiterhin wurde für eine Amphiregulin eine Östrogen/Östrogenrezeptorabhängige Hochregulation nachgewiesen (Ciarloni et al. 2007). An Exemestane, einem Aromatasehemmer, -resistenten Mammakarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass eine östrogenrezeptorabhängige Amphiregulin-Expression stattfindet (Wang et al. 2008).

Die anderen 19 Kandidaten-Gene unserer Region zeigen bei Analyse der bekannten Literatur keine eindeutige funktionelle Beziehung zu diesen Tumoreigenschaften. Bestenfalls könnte für die grosse Gruppe der Chemokine eine – bislang unbekannte – onkogene Funktion bezüglich des Plattenepithelkarzinoms postuliert werden. Die ersten 8 Mitglieder dieser Familie (CXCL1-CXCL8) sind Bestandteil unseres Amplikons.

Das nächste Ziel unseres Projektes war es weitere Informationen zur möglichen biologischen Relevanz von Veränderungen von Genen unserer 4q13.3-Amplifikation zu gewinnen. Das klassische Vorgehen für derartige Studienvorhaben wäre eine funktionelle Untersuchung an Zelllinien, wobei die Kandidaten-Gene abwechselnd ein- und ausgeschaltet werden, um zu klären, was für Effekte derartige Manipulationen auf potentielle Tumoreigenschaften der Zellen, wie Invasivität und Proliferation, ausüben. Solche Untersuchungen sind sehr zeit- und reagentienaufwendig. In unserem Fall müsste sie - bei Fehlen von wirklich starken Hinweisen, dass die von uns postulierten Kandidaten-Gene die richtigen Ziel-Gene sind - eigentlich für 21 verschiedene Gene angewendet werden. Die Untersuchung von TMAs mit Tumoren eines bestimmten Typs, für welche ausgedehnte klinische und pathologisch-anatomische Informationen vorliegen, ist ein alternatives Verfahren, um rasch Hinweise auf eine mögliche biologische Relevanz einer Amplifikation (unabhängig von den Zielgenen) zu finden. Dabei ist zu postulieren, dass ein für die Tumorbilogie besonders wichtiges Gen mit einem bestimmten (meist ungünstigen) klinischen/biologischen Verhalten einhergeht. Typische Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der „funktionellen“ Epidermologie sind HER2 und p53. Die HER2-Amplifikation kommt in ca. 17% der Mammakarzinome vor und charakterisiert dabei einen umschriebenen, unterdessen auch mittels Expressions-Array herauskristallisierten Tumorsubtyp mit einer besonders ungünstigen Prognose (Al-Kuraya et al. 2004). p53-Mutationen kommen bei vielen Tumorarten vor, sind bei vielen Tumorarten als Schlüsselereignisse anzusehen und definieren bei zahlreichen Tumorarten auch

besondere Subgruppen mit meist besonders schlechter Prognose. Tumoren, bei denen p53-Veränderungen mit ungünstiger Prognose assoziiert sind umfassen unter anderem Malignome der Prostata (Kudahetti et al. 2009), der Mamma (Petitjean et al. 2007), der Lunge (Nelson et al. 2005), der Leber und des hämatopoetischen Systems (Robles and Harris 2010).

Unser Ösophaguskarzinom-TMA beinhaltet Gewebe von 299 Primärtumoren von Patienten mit verfügbaren klinischen Verlaufsdaten. Die weitere Untersuchung konzentrierte sich deswegen auf Ösophaguskarzinome, weil diese in der Multitumor-TMA-Untersuchung besonders häufig Amplifikationen aufgewiesen hatten und wegen der Verfügbarkeit eines institutseigenen, qualitativ hervorragenden, bereits erprobten TMA. In einer frühen Untersuchung hatte man an diesem TMA keine eindeutige Prognoserelevanz von HER2-Amplifikationen bei Ösophaguskarzinom zeigen können (Reichert et al. 2007). Die Ösophaguskarzinomuntersuchung bestätigt, dass Amplifikationen beim Plattenepithelkarzinom signifikant häufiger vorkommen, als beim Adenokarzinom. Es ergibt sich aber innerhalb der Plattenepithelkarzinome keine Beziehung zu einem malignen Phänotyp bzw. zu der Patientenprognose. Somit ergeben sich keine Hinweise dafür, dass die 4q13.3-Amplifikation einen Tumorsubtyp mit herausstechender klinischer Bedeutung charakterisiert. Allerdings war die Zahl der amplifizierten Tumoren (n=11) relativ klein, so dass eine abschließende, sichere Beurteilung dieser Fragestellung nicht gegeben werden kann. Dies, obwohl unser Patientenkollektiv für Ösophaguskarzinomuntersuchungen überdurchschnittlich groß ist (Chang et al. 2010; Gen et al. 2010; Li et al. 2010b). Auffallend ist bei der Beurteilung der Zahlen unserer Studie auch die Tatsache, dass die Zahl der Amplifikationen in unserem Ösophagus-TMA mit 222 interpretierbaren (von 299 potentiell vorhandenen) Primärtumoren, darunter 139 Plattenepithel- (11 Amplifikationen) und 77 Adenokarzinomen (keine Amplifikation) deutlich geringer ist als in unserer Multitumor-TMA-Analyse mit 60 potentiell vorhandenen Adenokarzinomen (3 Amplifikationen) und 60 potentiell vorhandenen Plattenepithelkarzinomen (9 Amplifikationen). Wir sehen in dieser „Diskrepanz“ ein typisches Phänomen, welches dann auftritt, wenn relativ selten Phänomene in relativ geringen Tumormengen untersucht werden. Wenn 100 verschiedene Tumorarten auf ein seltenes Phänomen untersucht werden, kann es immer wieder vorkommen, dass eines der seltenen Phänomene in einer Tumorart überzufällig häufig vorkommt, so dass die hohen Erwartungen in die Häufigkeit des gefundenen Phänomens dann bei Validationsexperimenten enttäuscht werden. Ähnliche „Enttäuschungen“ ergeben sich heute auch in dem rasch wachsenden Feld der Gesamtgenomsequenzierung. Mittels moderner Sequenzieretechnologie ist es heute möglich, sämtliche Gene eines Tumors in

einer einzigen Untersuchung auf Mutation zu untersuchen (Voelkerding et al. 2009). Dies ist heute mit Kosten von 10.000-20.000 Euro pro Tumor möglich. Erste Untersuchungen mit dieser Technologie haben ergeben, dass Tumoren viel mehr Mutationen aufweisen als bisher gedacht. Viele Studien haben 100-200 Mutationen in kodierenden Genombereichen ergeben. Die meisten dieser Mutationen liegen in Genen, welche bisher nicht als besonders relevante Tumorgenkandidaten gehandelt wurden. Werden nun in einer Studie, welche 30.000 Gene in 20 Tumoren untersuchen, bestimmte Mutationen in zwei verschiedenen Tumoren gefunden, könnte man daraus schließen, dass diese Mutation für einen Tumor von besonderer Bedeutung ist. Erste Validierungen haben aber auch hier durchaus Enttäuschungen generiert. Beispielsweise wurde die GNAS-Mutation (guanine nucleotide binding protein) von der Vogelstein-Gruppe in 2 von 96 (2%), bzw. 3 von 35 (9%) untersuchten Kolonkarzinomen gefunden und als wichtiges Kolonkarzinom-Gen „identifiziert“ (Wood et al. 2007). Eine kürzlich untersuchte Validierungsstudie an der DNA von 215 verschiedenen Kolonkarzinom-Patienten ergab aber lediglich eine GNAS-Mutation in einem von 215 Fällen (Idziaszczyk et al. 2010).

Bei insgesamt 6 unserer Patienten (Plattenepithel- und Adenokarzinom zusammengefasst) lagen neben dem Primärtumor auch interpretierbare Anteile von Lymphknoten oder hämatogenen Metastasen vor. Der paarweise Vergleich von Tumoren aus Primärtumor und Metastasen ergab in der Regel eine Übereinstimmung des Amplifikationsbefundes. In abweichenden Fällen handelte es sich durchwegs um geringgradige Genvermehrungen bzw. geringgradige Amplifikationen, welche in der Metastase nicht mehr wiedergefunden werden konnten, so dass hier auch insignifikante Unterschiede bei etwas divergierender Auswertung zwischen Primärtumor und Metastase postuliert werden können. Insgesamt spricht die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse in Primärtumor und korrespondierenden Metastasen dafür, dass die 4q13.3-Amplifikation in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus - wenn sie auftritt - eher früh auftritt und eine relativ homogene Verteilung im Tumor aufweist. Wäre die 4q13.3-Amplifikation typischerweise nur auf ein kleines Areal eines Tumors beschränkt, wäre mit einer weniger hohen Übereinstimmung zwischen Primärtumor- und Metastasenbefunden zu rechnen, da davon ausgegangen werden müsste, dass nicht bei jedem Tumor dann auch die amplifizierten Areale bei der Herstellung des TMAs getroffen werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung, dass 4q13.3-Amplifikationen in humanen Tumoren selten vorkommen, wobei die höchsten Häufigkeiten bei Plattenepithelkarzinomen, bzw. bei hormonabhängigen gynäkologischen Tumoren auftreten. Zumindest beim von uns exemplarisch weiter untersuchten

Ösophaguskarzinom ergibt sich kein Hinweis auf eine besondere klinisch/biologische Bedeutung der 4q13.3-Amplifikation, da diese weder mit der Patientenprognose, noch mit einem malignen Phänotyp assoziiert war. Vergleichende Untersuchungen zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen ergaben beim Ösophaguskarzinom eine hohe Übereinstimmung des 4q13.3-Amplifikationsstatus, so dass postuliert werden kann, dass die 4q13.3-Amplifikation beim Ösophaguskarzinom zwar selten auftritt, wenn sie aber vorkommt eine eher frühe, und im Tumor homogen vorkommende Veränderung darstellt.

## 5 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Untersuchung war der Nachweis von umschriebenen, kurzstreckigen, hochgradigen 4q13.3-Amplifikationen in je einem Fall eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus und eines Urothelkarzinoms der Harnblase. Der kleinste gemeinsame Bereich der Amplifikationen beinhaltete 21 Gene. Die unmittelbar nebeneinander liegenden Gene Epiregulin (EREG) und Amphiregulin (AREG) erschienen aufgrund ihrer Funktion als Liganden mehrere Wachstumsrezeptoren, welche teilweise schon bekannte amplifizierte Onkogene sind, besonders interessant. Dies wäre vereinbar mit einer Rolle von Epiregulin und Amphiregulin für die Tumorbilogie im Falle einer Überexpression. Ziel der Untersuchung war die Klärung der Prävalenz von 4q13.3 (Amphiregulin/Epiregulin)-Amplifikationen in humanen Tumoren und das Gewinnen von Rückschlüssen auf die biologische Bedeutung dieser Amplifikation durch Vergleich von Amplifikationsdaten mit pathologisch-anatomischen und klinischen Parametern in einem ausgewählten Tumortyp. In einem ersten Schritt wurde ein Multitumor-Tissue Microarray (TMA), bestehend aus insgesamt 4034 Gewebeproben von 99 verschiedenen Tumortypen und Subtypen mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Dazu wurde eine Doppelhybridisierung mit einer kommerziell erhältlichen Zentromer4-Probe und einer selbst hergestellten pBAC-Probe für die Region 4q13.3 (Epiregulin und Amphiregulin beinhaltend) verwendet. Die Multitumor-TMA-Untersuchung ergab Amplifikationen vor allem in Ösophaguskarzinomen, Plattenepithelkarzinomen aller Art und potentiell hormonabhängigen Tumoren des weiblichen Genitaltraktes. Konkret fanden sich in den analysierbaren Tumoren 9 Amplifikationen im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und 3 Amplifikationen im Adenokarzinom des Ösophagus. Weitere Amplifikationen wurden in einem Kolonkarzinom, in einem Plattenepithelkarzinom des Anus, in einem Plattenepithelkarzinom des Larynx, in 3 Plattenepithelkarzinomen der Lunge, 2 serösen Karzinomen des Ovars, 2 serösen Karzinomen des Endometriums, sowie 8 Mammakarzinomen (medullärer, duktaler und muzinöser Typ) gefunden. Um die Beziehung der 4q13.3-Amplifikation mit klinisch-pathologischen Daten in einem bestimmten Tumortyp weiter zu untersuchen, wählten wir, aufgrund der hohen Häufigkeit und der Verfügbarkeit eines geeigneten TMAs, das Ösophaguskarzinom. Der Ösophaguskarzinom-TMA beinhaltete 163 Primärtumoren von Plattenepithelkarzinomen und 130 Primärtumoren von Adenokarzinomen sowie insgesamt 193 korrespondierende Lymphknoten und hämatogene Metastasen. Die Ösophagus-Studie ergab in Plattenepithelkarzinomen bei 139 auswertbaren Fällen 11 (7,91%) Amplifikationen und 5

(3,60%) geringgradige chromosomale Zugewinne. Im Adenokarzinom fand sich keine Amplifikation in den 77 erfolgreich untersuchten Tumoren. Eine geringgradige Vermehrung ( $\text{Ratio } 4q13.3/\text{Zentromer4} < 2,0$ ) fand sich in 4 (5,19%) der untersuchten Adenokarzinome. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 4q13.3-Amplifikationsstatus und dem Tumorgrad, dem pT-Stadium, dem pN-Stadium und dem klinischen Verlauf. Insgesamt zeigen die Daten unserer Studie, dass 4q13.3-Amplifikationen zwar bei verschiedenen Tumorarten vorkommen, in keiner Tumorart aber eine besonders hohe Häufigkeit einnimmt. Beim Ösophaguskarzinom ergeben sich keine Anhaltspunkte auf eine klinische Relevanz. Immerhin spricht die hohe Übereinstimmung des 4q13.3-Amplifikationsstatus zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen dafür, dass diese Alteration bei einem Subset von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus relativ früh auftritt und homogen im Tumor vorkommt.

**6 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: <b>Mechanismen zur Entstehung von entarteten Zellen</b> .....	9
Abbildung 2: <b>Die drei Amplifikationstypen</b> .....	12
Abbildung 3: <b>Breakage-Fusion-Bridge-Modell</b> .....	14
Abbildung 4: <b>Onion-Skin-Modell</b> .....	15
Abbildung 5: <b>Episom-Modell</b> .....	16
Abbildung 6: <b>Hairpin/Inverted repeat-Modell</b> .....	17
Abbildung 7: <b>Auswertung der SNP-Daten, Chromosom 4</b> .....	20
Abbildung 8: <b>Das 4q13.3-Amplikon</b> .....	22
Abbildung 9: <b>Schritte des Experiments</b> .....	28
Abbildung 10: <b>Konstruktion eines Tissue Microarrays (TMAs)</b> .....	29
Abbildung 11: <b>Tissue Microarray (TMA)</b> .....	30
Abbildung 12 : <b>Amplifikation im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus:</b> .....	42
Abbildung 13: <b>4q13.3 Amplifikationen</b> .....	44
Abbildung 14: <b>4q13.3-geringgradige Genvermehrungen</b> .....	45

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zugewinne im Bereich 4q13.3 .....	21
Tabelle 2: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, <b>Teil 1</b> .....	23
Tabelle 3: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, <b>Teil 2: die Chemokin-Familie</b> .....	24
Tabelle 4: Gene des überlappenden Bereiches im Amplikon 4q13.3, <b>Teil 3: die Wachstumsrezeptorliganden</b> .....	25
Tabelle 5: <b>Multitumor-TMA (A-H)</b> .....	31
Tabelle 6: <b>Ösophagus-TMA 1.1.-1</b> .....	32
Tabelle 7: <b>Ansatz für die Nick-Translation</b> .....	35
Tabelle 8: Ansatz für den Sonden-Hybridisierungs-Mix.....	37
Tabelle 9: <b>FISH: Kriterien</b> .....	38
Tabelle 10: <b>4q13.3-Amplifikationen</b> auf den Multitumor-TMAs .....	41
Tabelle 11: <b>4q13.3-Amplifikation</b> , Assoziation zum histologischen Typ im Ösophaguskarzinom .....	42
Tabelle 12: <b>4q13.3-Amplifikation</b> , Assoziation zu pT, pN, pM, histologischen Differenzierungsgrad im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus .....	43
Tabelle 13: Spots mit einer Amplifikation oder einer geringgradigen Genvermehrung mit den korrespondierenden Lymphknoten- oder Fernmetastasen im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.....	46
Tabelle 14: Spots mit einer Amplifikation oder einer geringgradigen Genvermehrung mit den korrelierenden Lymphknoten oder Fernmetastasen im Adenokarzinom des Ösophagus. ....	47

## 8 Literaturverzeichnis

- Al-Kuraya, K., P. Schraml, J. Torhorst, C. Tapia, B. Zaharieva, H. Novotny, H. Spichtin, R. Maurer, M. Mirlacher, O. Kochli, M. Zuber, H. Dieterich, F. Mross, K. Wilber, R. Simon and G. Sauter. 2004. "Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer." *Cancer Res* 64(23):8534-8540.
- Albertson, D. G. 2006. "Gene amplification in cancer." *Trends Genet* 22(8):447-455.
- Allen, N. P., H. Donniger, M. D. Vos, K. Eckfeld, L. Hesson, L. Gordon, M. J. Birrer, F. Latif and G. J. Clark. 2007. "RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors." *Oncogene* 26(42):6203-6211.
- Alroy, I. and Y. Yarden. 1997. "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions." *FEBS Lett* 410(1):83-86.
- Amsellem-Ouazana, D., I. Bieche, S. Tozlu, H. Botto, B. Debre and R. Lidereau. 2006. "Gene expression profiling of ERBB receptors and ligands in human transitional cell carcinoma of the bladder." *J Urol* 175(3 Pt 1):1127-1132.
- Bauman, J. G., J. Wiegant, P. Borst and P. van Duijn. 1980. "A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA." *Exp Cell Res* 128(2):485-490.
- Berasain, C., J. Castillo, M. J. Perugorria, J. Prieto and M. A. Avila. 2007. "Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis." *Cancer Lett* 254(1):30-41.
- Bieche, I., P. Onody, S. Tozlu, K. Driouch, M. Vidaud and R. Lidereau. 2003. "Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas." *Int J Cancer* 106(5):758-765.
- Bolusani, S., B. A. Young, N. A. Cole, A. S. Tibbetts, J. Momb, J. D. Bryant, A. Solmonson and D. R. Appling. 2010. "Mammalian MTHFD2l encodes a mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase isozyme expressed in adult tissues." *J Biol Chem*.
- Bostwick, D. G., J. Qian and N. J. Maihle. 2004. "Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases." *Prostate* 58(2):164-168.
- Boyle, P. and Levin, B. 2008. "World Cancer Report 2008." In *World Cancer Report 2008*, ed. P. Boyle, Levin, B. Lyon: IARC (International Agency for Research on Cancer).
- Bubendorf, L., J. Kononen, P. Koivisto, P. Schraml, H. Moch, T. C. Gasser, N. Willi, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi. 1999. "Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays." *Cancer Res* 59(4):803-806.
- Bubendorf, L., A. Nocito, H. Moch and G. Sauter. 2001. "Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies." *J Pathol* 195(1):72-79.
- Burandt, E. and G. Sauter. 2010. "[HER2 ASCO guidelines. The answer to everything?]." *Pathologe* 31 Suppl 2:285-291.
- Buselmaier, Werner, Tariverdian, Gholamali. 2007. "Mutationen und ihre Folgen für die Gesundheit." In *Humangenetik*. 4. Edition: Springer.

- Cahill, D. P., C. Lengauer, J. Yu, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. D. Markowitz, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998. "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers." *Nature* 392(6673):300-303.
- Cai, W. W., J. H. Mao, C. W. Chow, S. Damani, A. Balmain and A. Bradley. 2002. "Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays." *Nat Biotechnol* 20(4):393-396.
- Carrasco, D. R., G. Tonon, Y. Huang, Y. Zhang, R. Sinha, B. Feng, J. P. Stewart, F. Zhan, D. Khatry, M. Protopopova, A. Protopopov, K. Sukhdeo, I. Hanamura, O. Stephens, B. Barlogie, K. C. Anderson, L. Chin, J. D. Shaughnessy, Jr., C. Brennan and R. A. Depinho. 2006. "High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients." *Cancer Cell* 9(4):313-325.
- Carroll, S. M., M. L. DeRose, P. Gaudray, C. M. Moore, D. R. Needham-Vandevanter, D. D. Von Hoff and G. M. Wahl. 1988. "Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion." *Mol Cell Biol* 8(4):1525-1533.
- Carvalho, B., E. Ouwerkerk, G. A. Meijer and B. Ylstra. 2004. "High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides." *J Clin Pathol* 57(6):644-646.
- Chan, K. Y., P. B. Lai, J. A. Squire, B. Beheshti, N. L. Wong, S. M. Sy and N. Wong. 2006. "Positional expression profiling indicates candidate genes in deletion hotspots of hepatocellular carcinoma." *Mod Pathol* 19(12):1546-1554.
- Chang, Y. C., K. T. Yeh, T. C. Liu and J. G. Chang. 2010. "Molecular cytogenetic characterization of esophageal cancer detected by comparative genomic hybridization." *J Clin Lab Anal* 24(3):167-174.
- Cheng, S. H., M. H. Ng, K. M. Lau, H. S. Liu, J. C. Chan, A. B. Hui, K. W. Lo, H. Jiang, J. Hou, R. W. Chu, W. S. Wong, N. P. Chan and H. K. Ng. 2007. "4q loss is potentially an important genetic event in MM tumorigenesis: identification of a tumor suppressor gene regulated by promoter methylation at 4q13.3, platelet factor 4." *Blood* 109(5):2089-2099.
- Ciarloni, L., S. Mallepell and C. Brisken. 2007. "Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13):5455-5460.
- Coudert, L., Khaireh, I., Lalanne, V. et Kramer, I. 2007. "L'ADN, le code génétique, la transcription en ARNm et sa traduction en protéine par le ribosome. [Online im Internet.] URL: <http://www.cellbiol.net/ste/alphHERCEPTIN6.php> [Stand: 10.01.2011, 15:05].", ed. Bordeaux Institut Europeen de Chimie et Biologie, France, URL: <http://www.cellbiol.net/ste/alphHERCEPTIN6.php>. Bordeaux, Frankreich: Institut Europeen de Chimie et Biologie.
- D'Antonio, A., S. Losito, S. Pignata, M. Grassi, F. Perrone, A. De Luca, R. Tambaro, C. Bianco, W. J. Gullick, G. R. Johnson, V. R. Iaffaioli, D. S. Salomon and N. Normanno. 2002. "Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas." *Int J Oncol* 21(5):941-948.
- Department of Energy Genome Programs. 2008. "SNP Fact Sheet [Online im Internet.] URL: [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml) [Stand: 09.01.2011, 15:06].", ed. U.S. Department of Energy Genome Programs.
- Doll, D., L. Keller, M. Maak, A. L. Boulesteix, J. R. Siewert, B. Holzmann and K. P. Janssen. 2010. "Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival." *Int J Colorectal Dis* 25(5):573-581.

- Dunbar, A. J. and C. Goddard. 2000. "Structure-function and biological role of betacellulin." *Int J Biochem Cell Biol* 32(8):805-815.
- Dutt, A., Beroukhi, R. 2007. "Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer." *Curr Opin Oncol* 19(1):43-49.
- Dutt, S. S. and A. C. Gao. 2009. "Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression." *Future Oncol* 5(9):1403-1413.
- Ebert, M., M. Yokoyama, M. S. Kobrin, H. Friess, M. E. Lopez, M. W. Buchler, G. R. Johnson and M. Korc. 1994. "Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer." *Cancer Res* 54(15):3959-3962.
- Ejskjaer, K., B. S. Sorensen, S. S. Poulsen, A. Forman, E. Nexø and O. Mogensen. 2007. "Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer." *Gynecol Oncol* 104(1):158-167.
- Evdokimova, V. N. and L. H. Butterfield. 2008. "Alpha-fetoprotein and other tumour-associated antigens for immunotherapy of hepatocellular cancer." *Expert Opin Biol Ther* 8(3):325-336.
- Fladeby, C., S. N. Gupta, N. Barois, P. I. Lorenzo, J. C. Simpson, F. Saatcioglu and O. Bakke. 2008. "Human PARM-1 is a novel mucin-like, androgen-regulated gene exhibiting proliferative effects in prostate cancer cells." *Int J Cancer* 122(6):1229-1235.
- Fontanini, G., M. De Laurentiis, S. Vignati, S. Chine, M. Lucchi, V. Silvestri, A. Mussi, S. De Placido, G. Tortora, A. R. Bianco, W. Gullick, C. A. Angeletti, G. Bevilacqua and F. Ciardiello. 1998. "Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival." *Clin Cancer Res* 4(1):241-249.
- Gen, Y., K. Yasui, Y. Zen, K. Zen, O. Dohi, M. Endo, K. Tsuji, N. Wakabayashi, Y. Itoh, Y. Naito, M. Taniwaki, Y. Nakanuma, T. Okanoue and T. Yoshikawa. 2010. "SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer Genet Cytogenet* 202(2):82-93.
- Gupta, G. P., D. X. Nguyen, A. C. Chiang, P. D. Bos, J. Y. Kim, C. Nadal, R. R. Gomis, K. Manova-Todorova and J. Massague. 2007. "Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis." *Nature* 446(7137):765-770.
- Haber, J. E. and M. Debatisse. 2006. "Gene amplification: yeast takes a turn." *Cell* 125(7):1237-1240.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg. 2000. "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1):57-70.
- Harris, R. C., E. Chung and R. J. Coffey. 2003. "EGF receptor ligands." *Exp Cell Res* 284(1):2-13.
- Hesketh, R. 1997. *The Oncogene & Tumour Suppressor Gene Factsbook* Elsevier Inc.
- Hsieh, P. and K. Yamane. 2008. "DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing." *Mech Ageing Dev* 129(7-8):391-407.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane. 2005. "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* 5(5):341-354.
- Idziaszczyk, S., C. H. Wilson, C. G. Smith, D. J. Adams and J. P. Cheadle. 2010. "Analysis of the frequency of GNAS codon 201 mutations in advanced colorectal cancer." *Cancer Genet Cytogenet* 202(1):67-69.

- Jarvinen, A. K., R. Autio, S. Haapa-Paananen, M. Wolf, M. Saarela, R. Grenman, I. Leivo, O. Kallioniemi, A. A. Makitie and O. Monni. 2006. "Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses." *Oncogene* 25(52):6997-7008.
- Jascur, T. and C. R. Boland. 2006. "Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system." *Int J Cancer* 119(9):2030-2035.
- Jerkovic, L., A. F. Voegelé, S. Chwatal, F. Kronenberg, C. M. Radcliffe, M. R. Wormald, E. M. Lobentanz, B. Ezech, P. Eller, N. Dejori, B. Dieplinger, F. Lottspeich, W. Sattler, M. Uhr, K. Mechtler, R. A. Dwek, P. M. Rudd, G. Baier and H. Dieplinger. 2005. "Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression." *J Proteome Res* 4(3):889-899.
- Jonsson, G., J. Staaf, E. Olsson, M. Heidenblad, J. Vallon-Christersson, K. Osoegawa, P. de Jong, S. Oredsson, M. Ringner, M. Hoglund and A. Borg. 2007. "High-resolution genomic profiles of breast cancer cell lines assessed by tiling BAC array comparative genomic hybridization." *Genes Chromosomes Cancer* 46(6):543-558.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J. W. Gray, F. Waldman and D. Pinkel. 1992. "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." *Science* 258(5083):818-821.
- Kim, S. and A. Misra. 2007. "SNP genotyping: technologies and biomedical applications." *Annu Rev Biomed Eng* 9:289-320.
- Knudson, A. G. 2000. "Chasing the cancer demon." *Annu Rev Genet* 34:1-19.
- Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi. 1998. "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med* 4(7):844-847.
- Koppert, L. B., B. P. Wijnhoven, H. van Dekken, H. W. Tilanus and W. N. Dinjens. 2005. "The molecular biology of esophageal adenocarcinoma." *J Surg Oncol* 92(3):169-190.
- Kraus, I., C. Driesch, S. Vinokurova, E. Hovig, A. Schneider, M. von Knebel Doeberitz and M. Durst. 2008. "The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes." *Cancer Res* 68(7):2514-2522.
- Ku, G. Y. and D. H. Ilson. 2010. "Esophagogastric cancer: targeted agents." *Cancer Treat Rev* 36(3):235-248.
- Kudahetti, S., G. Fisher, L. Ambroisine, C. Foster, V. Reuter, J. Eastham, H. Moller, M. W. Kattan, C. S. Cooper, P. Scardino, J. Cuzick and D. M. Berney. 2009. "p53 immunohistochemistry is an independent prognostic marker for outcome in conservatively treated prostate cancer." *BJU Int* 104(1):20-24.
- Kuwahara, Y., C. Tanabe, T. Ikeuchi, K. Aoyagi, M. Nishigaki, H. Sakamoto, K. Hoshinaga, T. Yoshida, H. Sasaki and M. Terada. 2004. "Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers." *Genes Chromosomes Cancer* 41(2):125-132.
- LaMarca, H. L. and J. M. Rosen. 2007. "Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage." *Breast Cancer Res* 9(4):304.
- Lee, D.C. and C.L. Hinkle. 2003. "EGF family ligands." In *The Cytokine Handbook*, ed. Thomsen A.W. London: Elsevier Science Ltd.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998. "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* 396(6712):643-649.

- Li, X. D., S. Y. Miao, G. L. Wang, L. Yang, Y. Q. Shu and Y. M. Yin. 2010a. "Amphiregulin and epiregulin expression in colorectal carcinoma and the correlation with clinicopathological characteristics." *Onkologie* 33(7):353-358.
- Li, Y., C. J. Nie, L. Hu, Y. Qin, H. B. Liu, T. T. Zeng, L. Chen, L. Fu, W. Deng, S. P. Chen, W. H. Jia, C. Zhang, D. Xie and X. Y. Guan. 2010b. "Characterization of a novel mechanism of genomic instability involving the SEI1/SET/NM23H1 pathway in esophageal cancers." *Cancer Res* 70(14):5695-5705.
- Livingstone, L. R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks and T. D. Tlsty. 1992. "Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53." *Cell* 70(6):923-935.
- Lo, A. W., L. Sabatier, B. Fouladi, G. Pottier, M. Ricoul and J. P. Murnane. 2002. "DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line." *Neoplasia* 4(6):531-538.
- Lugli, A., Y. Forster, P. Haas, A. Nocito, C. Bucher, H. Bissig, M. Mirlacher, M. Storz, M. J. Mihatsch and G. Sauter. 2003. "Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples." *Hum Pathol* 34(10):994-1000.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman and D. A. Haber. 2004. "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* 350(21):2129-2139.
- McBryan, J., J. Howlin, S. Napoletano and F. Martin. 2008. "Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(2):159-169.
- McClintock, B. 1941. "The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*." *Genetics* 26(2):234-282.
- McIntyre, E., E. Blackburn, P. J. Brown, C. G. Johnson and W. J. Gullick. 2010. "The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 122(1):105-110.
- Michels, E., K. De Preter, N. Van Roy and F. Speleman. 2007. "Detection of DNA copy number alterations in cancer by array comparative genomic hybridization." *Genet Med* 9(9):574-584.
- Mizejewski, G. J. 2001. "Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants." *Exp Biol Med (Maywood)* 226(5):377-408.
- Mondello, C., A. Smirnova and E. Giulotto. 2010. "Gene amplification, radiation sensitivity and DNA double-strand breaks." *Mutat Res* 704(1-3):29-37.
- Myllykangas, S. and S. Knuutila. 2006. "Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications." *Cancer Lett* 232(1):79-89.
- Narayan, G., V. Bourdon, S. Chaganti, H. Arias-Pulido, S. V. Nandula, P. H. Rao, L. Gissmann, M. Durst, A. Schneider, B. Pothuri, M. Mansukhani, K. Basso, R. S. Chaganti and V. V. Murty. 2007. "Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes." *Genes Chromosomes Cancer* 46(4):373-384.
- Nelson, H. H., M. Wilkojmen, C. J. Marsit and K. T. Kelsey. 2005. "TP53 mutation, allelism and survival in non-small cell lung cancer." *Carcinogenesis* 26(10):1770-1773.

- Nishimura, T., A. Andoh, O. Inatomi, M. Shioya, Y. Yagi, T. Tsujikawa and Y. Fujiyama. 2008. "Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon." *Oncol Rep* 19(1):105-110.
- Oeggerli, M., P. Schraml, C. Ruiz, M. Bloch, H. Novotny, M. Mirlacher, G. Sauter and R. Simon. 2006. "E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer." *Oncogene* 25(49):6538-6543.
- Okuno, Y., P. J. Hahn and D. M. Gilbert. 2004. "Structure of a palindromic amplicon junction implicates microhomology-mediated end joining as a mechanism of sister chromatid fusion during gene amplification." *Nucleic Acids Res* 32(2):749-756.
- Paez, J. G., P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson and M. Meyerson. 2004. "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." *Science* 304(5676):1497-1500.
- Petitjean, A., M. I. Achatz, A. L. Borresen-Dale, P. Hainaut and M. Olivier. 2007. "TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes." *Oncogene* 26(15):2157-2165.
- Pinkel, D., R. Seagraves, D. Sudar, S. Clark, I. Poole, D. Kowbel, C. Collins, W. L. Kuo, C. Chen, Y. Zhai, S. H. Dairkee, B. M. Ljung, J. W. Gray and D. G. Albertson. 1998. "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays." *Nat Genet* 20(2):207-211.
- Pollack, J. R., C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein and P. O. Brown. 1999. "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays." *Nat Genet* 23(1):41-46.
- Reddy, K. S. 2007. "Double minutes (dmin) and homogeneously staining regions (hsr) in myeloid disorders: a new case suggesting that dmin form hsr in vivo." *Cytogenet Genome Res* 119(1-2):53-59.
- Reichelt, U., P. Duesedau, MCh Tsourlakis, A. Quaas, B. C. Link, P. G. Schurr, J. T. Kaifi, S. J. Gros, E. F. Yekebas, A. Marx, R. Simon, J. R. Izbicki and G. Sauter. 2007. "Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus." *Mod Pathol* 20(1):120-129.
- Renan, M. J. 1993. "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." *Mol Carcinog* 7(3):139-146.
- Revillion, F., V. Lhotellier, L. Hornez, J. Bonnetterre and J. P. Peyrat. 2008. "ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis." *Ann Oncol* 19(1):73-80.
- Robles, A. I. and C. C. Harris. 2010. "Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(3):a001016.
- Rocha-Lima, C. M., H. P. Soares, L. E. Raez and R. Singal. 2007. "EGFR targeting of solid tumors." *Cancer Control* 14(3):295-304.
- Roversi, G., R. Pfundt, R. F. Moroni, I. Magnani, S. van Reijmersdal, B. Pollo, H. Straatman, L. Larizza and E. F. Schoenmakers. 2006. "Identification of novel genomic markers related to progression to glioblastoma through genomic profiling of 25 primary glioma cell lines." *Oncogene* 25(10):1571-1583.
- Ruf, G. 2001. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Ösophaguskarzinoms. Freiburg: Tumorzentrum Ludwig Heilmeyer - Comprehensive Cancer Center Freiburg CCCF

- Rygiel, A. M., F. Milano, F. J. Ten Kate, A. Schaap, K. K. Wang, M. P. Peppelenbosch, J. J. Bergman and K. K. Krishnadath. 2008. "Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(6):1380-1385.
- Sacconi, S., E. Trevisson, F. Pistollato, M. C. Baldoin, R. Rezzonico, I. Bourget, C. Desnuelle, R. Tenconi, G. Basso, S. DiMauro and L. Salviati. 2005. "hCOX18 and hCOX19: two human genes involved in cytochrome c oxidase assembly." *Biochem Biophys Res Commun* 337(3):832-839.
- Salomon, D. S., R. Brandt, F. Ciardiello and N. Normanno. 1995. "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3):183-232.
- Scheble, V. J., M. Braun, R. Beroukhim, C. H. Mermel, C. Ruiz, T. Wilbertz, A. C. Stiedl, K. Petersen, M. Reischl, R. Kuefer, D. Schilling, F. Fend, G. Kristiansen, M. Meyerson, M. A. Rubin, L. Bubendorf and S. Perner. 2010. "ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor." *Mod Pathol* 23(8):1061-1067.
- Schneider, M. R. and E. Wolf. 2009. "The epidermal growth factor receptor ligands at a glance." *J Cell Physiol* 218(3):460-466.
- Schraml, P., J. Kononen, L. Bubendorf, H. Moch, H. Bissig, A. Nocito, M. J. Mihatsch, O. P. Kallioniemi and G. Sauter. 1999. "Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types." *Clin Cancer Res* 5(8):1966-1975.
- Shigeishi, H., K. Higashikawa, M. Hiraoka, S. Fujimoto, Y. Mitani, K. Ohta, M. Takechi and N. Kamata. 2008. "Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas." *Oncol Rep* 19(6):1557-1564.
- Shimizu, N. 2009. "Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research." *Cytogenet Genome Res* 124(3-4):312-326.
- Shirakata, Y., T. Komurasaki, H. Toyoda, Y. Hanakawa, K. Yamasaki, S. Tokumaru, K. Sayama and K. Hashimoto. 2000. "Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes." *J Biol Chem* 275(8):5748-5753.
- Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer and P. Lichter. 1997. "Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." *Genes Chromosomes Cancer* 20(4):399-407.
- Speicher, M. R. and N. P. Carter. 2005. "The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology." *Nat Rev Genet* 6(10):782-792.
- Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto and G. M. Wahl. 1989. "Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification." *Cell* 57(6):901-908.
- Stark, G. R. and G. M. Wahl. 1984. "Gene amplification." *Annu Rev Biochem* 53:447-491.
- Statistisches Bundesamt, Deutschland 2009. "Todesursachen. Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) [Online im Internet.]".
- Strachan, L., J. G. Murison, R. L. Prestidge, M. A. Sleeman, J. D. Watson and K. D. Kumble. 2001. "Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily." *J Biol Chem* 276(21):18265-18271.

- Struski, S., M. Doco-Fenzy and P. Cornillet-Lefebvre. 2002. "Compilation of published comparative genomic hybridization studies." *Cancer Genet Cytogenet* 135(1):63-90.
- Sun, B., J. Wu, T. Zhang and C. Wang. 2008. "High-resolution analysis of genomic profiles of hepatocellular carcinoma cells with differential osteopontin expression." *Cancer Biol Ther* 7(3):387-391.
- Taby, R. and J. P. Issa. 2010. "Cancer epigenetics." *CA Cancer J Clin* 60(6):376-392.
- Tanaka, H., D. A. Bergstrom, M. C. Yao and S. J. Tapscott. 2005. "Widespread and nonrandom distribution of DNA palindromes in cancer cells provides a structural platform for subsequent gene amplification." *Nat Genet* 37(3):320-327.
- Tanaka, H. and M. C. Yao. 2009. "Palindromic gene amplification--an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome." *Nat Rev Cancer* 9(3):216-224.
- Tao, W. 2005. "The mitotic checkpoint in cancer therapy." *Cell Cycle* 4(11):1495-1499.
- Thogersen, V. B., B. S. Sorensen, S. S. Poulsen, T. F. Orntoft, H. Wolf and E. Nexø. 2001. "A subclass of HER1 ligands are prognostic markers for survival in bladder cancer patients." *Cancer Res* 61(16):6227-6233.
- Toyoda, H., T. Komurasaki, D. Uchida and S. Morimoto. 1997. "Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family." *Biochem J* 326 ( Pt 1):69-75.
- Toyoda, H., T. Komurasaki, D. Uchida, Y. Takayama, T. Isobe, T. Okuyama and K. Hanada. 1995. "Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes." *J Biol Chem* 270(13):7495-7500.
- Toyota, M. and H. Suzuki. 2010. "Epigenetic drivers of genetic alterations." *Adv Genet* 70:309-323.
- Tsai, S. T., K. Y. Yang, Y. T. Jin, Y. C. Lin, M. T. Chang and L. W. Wu. 2006. "Amphiregulin as a tumor promoter for oral squamous cell carcinoma: involvement of cyclooxygenase 2." *Oral Oncol* 42(4):381-390.
- Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf. 2008. "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." *Cancer Lett* 267(2):226-244.
- Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf. 2010. "The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer." *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Vauhkonen, H., M. Vauhkonen, A. Sajantila, P. Sipponen and S. Knuutila. 2006. "Characterizing genetically stable and unstable gastric cancers by microsatellites and array comparative genomic hybridization." *Cancer Genet Cytogenet* 170(2):133-139.
- Voelkerding, K. V., S. A. Dames and J. D. Durtschi. 2009. "Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics." *Clin Chem* 55(4):641-658.
- Wahl, G. M. 1989. "The importance of circular DNA in mammalian gene amplification." *Cancer Res* 49(6):1333-1340.
- Wang, X., S. Masri, S. Phung and S. Chen. 2008. "The role of amphiregulin in exemestane-resistant breast cancer cells: evidence of an autocrine loop." *Cancer Res* 68(7):2259-2265.
- Watanabe, T. and T. Horiuchi. 2005. "A novel gene amplification system in yeast based on double rolling-circle replication." *EMBO J* 24(1):190-198.

- Watt, A. J., E. A. Jones, J. M. Ure, D. Peddie, D. I. Wilson and L. M. Forrester. 2001. "A gene trap integration provides an early in situ marker for hepatic specification of the foregut endoderm." *Mech Dev* 100(2):205-215.
- Went, P. T., S. Dirnhofer, M. Bundi, M. Mirlacher, P. Schraml, S. Mangialaio, S. Dimitrijevic, J. Kononen, A. Lugli, R. Simon and G. Sauter. 2004. "Prevalence of KIT expression in human tumors." *J Clin Oncol* 22(22):4514-4522.
- Willmarth, N. E. and S. P. Ethier. 2008. "Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(2):171-179.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu and B. Vogelstein. 2007. "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* 318(5853):1108-1113.
- Xie, K. 2001. "Interleukin-8 and human cancer biology." *Cytokine Growth Factor Rev* 12(4):375-391.
- Yamada, M., Y. Ichikawa, S. Yamagishi, N. Momiyama, M. Ota, S. Fujii, K. Tanaka, S. Togo, S. Ohki and H. Shimada. 2008. "Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 14(8):2351-2356.
- Yin, Y., M. A. Tainsky, F. Z. Bischoff, L. C. Strong and G. M. Wahl. 1992. "Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles." *Cell* 70(6):937-948.
- Yonesaka, K., K. Zejnullahu, N. Lindeman, A. J. Homes, D. M. Jackman, F. Zhao, A. M. Rogers, B. E. Johnson and P. A. Janne. 2008. "Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers." *Clin Cancer Res* 14(21):6963-6973.
- Yotsumoto, F., H. Yagi, S. O. Suzuki, E. Oki, H. Tsuchioka, T. Hachisuga, K. Sonoda, T. Kawarabayashi, E. Mekada and S. Miyamoto. 2008. "Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy." *Biochem Biophys Res Commun* 365(3):555-561.
- Zhang, X. and A. Chang. 2007. "Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell lung cancer." *J Med Genet* 44(3):166-172.
- Zhou, X., N. P. Rao, S. W. Cole, S. C. Mok, Z. Chen and D. T. Wong. 2005. "Progress in concurrent analysis of loss of heterozygosity and comparative genomic hybridization utilizing high density single nucleotide polymorphism arrays." *Cancer Genet Cytogenet* 159(1):53-57.
- Zhu, Z., J. Kleeff, H. Friess, L. Wang, A. Zimmermann, Y. Yarden, M. W. Buchler and M. Korc. 2000. "Epiregulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth." *Biochem Biophys Res Commun* 273(3):1019-1024.

## **9 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Guido Suter, PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, Dipl. Biol. Frederik Holst, Dipl. Biol. Antje Krohn, Dipl. Biol. Lia Burkhardt und Dr. Pierre Tennstedt für die Betreuung während meiner Doktorarbeit. Bei jeder noch so kleinen Frage bin ich auf ein offenes und hilfsbereites Ohr gestossen.

Danken möchte ich auch dem Team der FISH-Analyse im Labor für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit.

Ich widme diese Arbeit meinem verstorbenen Vater Dr. med. Bernd Rüdiger Sandmann.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

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: .....