

# *ESR1*-Amplifikationen in humanen gynäkologischen Tumoren

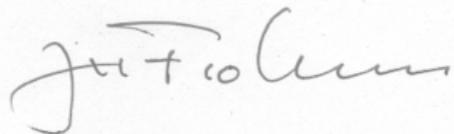
Dissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Frederik Holst  
aus Hamburg

Hamburg 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. R. SIMON  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. T. BURMESTER  
Tag der Disputation: 18. November 2011

Hamburg, den 04. November 2011



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Gynäkologische Tumore</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 Das Mammakarzinom.....	13
1.1.2 Das Endometriumkarzinom.....	14
1.1.3 Das Ovarialkarzinom.....	15
<b>1.2 Molekulargenetische Grundlagen</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Allgemeine Molekulargenetik maligner Tumoren .....	16
1.2.2 Bedeutung des Östrogenrezeptors für die Entstehung maligner gynäkologischer Tumore .....	19
1.2.2.1 Bedeutung für das Mammakarzinom.....	21
1.2.2.2 Bedeutung für das Endometriumkarzinom .....	23
1.2.2.3 Bedeutung für das Ovarialkarzinom .....	24
<b>1.3 Genamplifikationen</b> .....	<b>25</b>
1.3.1 Amplifikationstypen.....	28
1.3.2 Genamplifikationsmechanismen .....	31
1.3.2.1 Homologe Rekombination .....	31
1.3.2.2 Das Breakage-Fusion-Bridge-Modell.....	33
1.3.2.3 Der Replikationsgabelmechanismus: das „Onion-Skin“-Modell .....	35
<b>1.4 Evaluierung und Spezifizierung von Methoden zur Detektion von Genamplifikationen</b> .....	<b>37</b>
1.4.1 Southern Blot.....	37
1.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	39
1.4.3 Komparative genomische Hybridisierung (CGH), aCGH und Genchips .....	42
1.4.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) .....	46
<b>1.5 Vorarbeiten</b> .....	<b>48</b>
<b>1.6 Ziel der Arbeit, Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>50</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>52</b>
<b>2.1 Gewebekollektiv</b> .....	<b>52</b>
2.1.1 Gewebekollektiv Mamma.....	52
2.1.1.1 Gewebekollektiv des „Amplifikations-Test-TMA“ .....	52
2.1.1.2 Gewebekollektiv des Prognose- und Progressions-TMAs .....	52

---

2.1.1.3 Gewebekollektiv für die Kartierung des <i>ESR1</i> -Amplikons .....	54
2.1.1.4 Gewebekollektive für die qRT-PCR.....	56
2.1.2 Gewebekollektiv Endometrium .....	57
2.1.3 Gewebekollektiv Ovar .....	58
<b>2.2 Immunhistochemie .....</b>	<b>58</b>
<b>2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....</b>	<b>59</b>
2.3.1 pBAC-E. coli-Klon-Kultivierung.....	60
2.3.2 DNS-Extraktion für die FISH-Sondenherstellung.....	61
2.3.3 DNS-Markierung mittels „Nick-Translation“ .....	63
2.3.4 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung .....	65
2.3.5 Hybridisierung.....	66
2.3.6 Detektion.....	69
2.3.7 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	70
2.3.8 Kartierung genomischer DNS-Amplifikationen mittels der FISH-Methode.....	71
<b>2.4 Lasermikrodissektion .....</b>	<b>72</b>
<b>2.5 Qualitative Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>74</b>
2.5.1 Qualitative Polymerase Kettenreaktion zur Überprüfung der pBAC-DNS .....	74
2.5.2 Qualitative Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Produkts der qualitativen PCR .....	77
<b>2.6 Quantitative „Real Time“ Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) .....</b>	<b>79</b>
2.6.1 DNS-Extraktion aus formalinfixiertem Paraffingewebe.....	79
2.6.1.1 Entparaffinierung von formalinfixiertem Paraffingewebe.....	80
2.6.1.2 DNS-Extraktion aus entparaffiniertem formalinfixiertem Gewebe.....	81
2.6.2 DNS-Extraktion aus lasermikrodisseziertem formalinfixiertem Paraffingewebe ....	82
2.6.3 Quantitative PCR (qPCR) zur Messung der <i>ESR1</i> -Kopiezahl .....	84
<b>2.7 Statistik.....</b>	<b>87</b>
2.7.1 Epidemiologische Bewertung der <i>ESR1</i> -Amplifikation .....	87
2.7.2 Auswertung der qRT-PCR.....	87
2.7.2.1 Berechnung der relativen Kopiezahlverhältnisse .....	87
2.7.2.2 Normalisierung der relativen Kopiezahlverhältnisse aus der qRT-PCR .....	89
2.7.2.3 Statistische Auswertung der qPCR mit dem U-Test .....	89
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1 <i>ESR1</i>-Amplifikationen beim Mammakarzinom .....</b>	<b>90</b>
3.1.1 Häufigkeit und Typ der <i>ESR1</i> -Amplifikation und ihre Verteilung auf die histologischen Subtypen.....	90
3.1.2 Vergleich mit der ER-Expression.....	92
3.1.3 Kartierung des <i>ESR1</i> -Amplikons.....	94

---

3.1.3.1	Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit .....	94
3.1.3.2	Ausdehnung der <i>ESR1</i> -Amplikons .....	95
3.1.4	Qualitative PCR zur Überprüfung der verwendeten pBAC-Human-DNS .....	99
3.1.5	Validierung der <i>ESR1</i> -Amplifikation mit qRT-PCR .....	100
3.1.5.1	qRT-PCR mit Geweben aus dem „Amplifikations-Test-TMA“ .....	100
3.1.5.2	qRT-PCR mit Geweben aus einem alternativen Kollektiv .....	105
3.1.6	Prädiktive Relevanz der <i>ESR1</i> -Kopiezahlvermehrungen .....	110
3.1.7	Untersuchung auf das Vorkommen von <i>PGR</i> -Amplifikationen im Zusammenhang mit <i>ESR1</i> -Amplifikationen .....	113
<b>3.2</b>	<b><i>ESR1</i>-Amplifikationen beim Endometriumkarzinom .....</b>	<b>114</b>
3.2.1	ER-Expression .....	114
3.2.2	<i>ESR1</i> -Amplifikation .....	114
<b>3.3</b>	<b><i>ESR1</i>-Amplifikationen beim Ovarialkarzinom .....</b>	<b>118</b>
3.3.1	ER-Expression .....	118
3.3.2	<i>ESR1</i> Amplifikation .....	118
<b>3.4</b>	<b><i>ESR2</i>-Kopiezahlen in den Geweben des „Amplifikations-Test-TMA“ .....</b>	<b>121</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>122</b>
<b>4.1</b>	<b>Die <i>ESR1</i>-Amplifikation beim Mammakarzinom .....</b>	<b>122</b>
4.1.1	Die Häufigkeit der <i>ESR1</i> -Amplifikation und ihre Verteilung auf die histologischen Subtypen .....	122
4.1.2	Vergleich mit der ER-Expression .....	123
4.1.3	Kartierung des <i>ESR1</i> -Lokus .....	124
4.1.4	Prognostische Relevanz der <i>ESR1</i> -Kopiezahlvermehrungen .....	127
<b>4.2</b>	<b>Die <i>ESR1</i>-Amplifikation beim Endometriumkarzinom .....</b>	<b>130</b>
<b>4.3</b>	<b>Die <i>ESR1</i>-Amplifikation beim Ovarialkarzinom .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4</b>	<b>Technische Fragestellungen .....</b>	<b>138</b>
4.4.1	Technische Herausforderungen bei der FISH-Analyse .....	138
4.4.2	Messung der <i>ESR1</i> -Kopiezahl mit qPCR .....	145
4.4.3	Technische Fragestellungen bei aCGH, Genchips und qPCR .....	148
<b>4.5</b>	<b><i>ESR1</i>-Amplifikationen in der Literatur .....</b>	<b>154</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>159</b>
<b>6</b>	<b>Kooperationen .....</b>	<b>162</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
	<b>Danksagungen .....</b>	<b>183</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>1</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b><i>AIB</i></b>	„Amplified in breast cancer-1“ (Gen)
<b>Amp.</b>	Amplifikation(en)
<b><i>APC</i></b>	„adenomatous polyposis coli“ (Gen)
<b>AR</b>	Androgenrezeptor
<b><i>AR</i></b>	Gen des Androgenrezeptors
<b><i>ASXL2</i></b>	„Additional sex combs-like protein 2“ (Gen)
<b>B</b>	Breite
<b><i>BCL2</i></b>	„B-cell-leukemia/lymphoma-2“ (Gen)
<b>bp</b>	Basenpaare
<b><i>BRCA1</i></b>	„Breast Cancer 1“ (Gen)
<b><i>BRCA2</i></b>	„Breast Cancer 2“ (Gen)
<b>BRE</b>	Bloom-Richardson-Elston
<b>bzgl.</b>	bezüglich
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>ca.</b>	circa (ungefähr)
<b><i>CCND1</i></b>	Cyclin D1 (Gen)
<b>CGH</b>	„Comparative genomic hybridization“ (Komparative genomische Hybridisierung)
<b>DAPI</b>	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<b><i>DCC</i></b>	„Deleted in colon cancer“ (Deletiert beim Kolonkarzinom) (Gen)
<b>DCIS</b>	Duktales Carcinoma in situ
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deionisiertes Wasser einer Millipore Aufbereitungsanlage
<b>DIG</b>	Digoxigenin

---

<b>DNA</b>	„Desoxyribonucleic acid“ (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DSB</b>	„Double Strand Breaks“ (Doppelstrangbrüche)
<b>dTTP</b>	Desoxythymidintriphosphat
<b>dUTP</b>	Desoxyuraciltriphosphat
<b>E2F3</b>	„E2F transcription factor 3“
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-tetraacetat, di-Natriumsalz
<b>EGFR</b>	„Epidermal growth factor receptor“ (Gen)
<b>Epub</b>	elektronische Publikation im internationalen Rechnernetzwerk
<b>ER</b>	„Estrogen receptor“ (Östrogenrezeptor) (Protein)
<b>ERBB2</b>	„Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2“ (auch: <i>HER2</i> ) (Gen)
<b>ESR1</b>	„Estrogen-receptor-1(alpha)“ (Gen)
<b>ESR2</b>	„Estrogen receptor-2(beta)“ (ER-β)
<b>et al.</b>	„et alii“ (und Mitarbeiter)
<b>FAM</b>	Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein
<b>FAM38B</b>	„Family with sequence similarity 38, member B“ (Gen)
<b>FIGO</b>	„Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique“ (franz. für Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde)
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorescein)
<b>G</b>	Guanin
<b>g</b>	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ; „gravity“)
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>GnRH</b>	„Gonadotropin-Releasing-Hormon“
<b>GS</b>	Großschnitt
<b>H</b>	Höhe
<b>Her1</b>	„Human epidermal growth factor receptor 1“ (Protein)

---

<b>HER2</b>	„Human epidermal growth factor receptor 2“ (auch: <i>ERBB2</i> ) (Gen)
<b>Her4</b>	„Human epidermal growth factor receptor 4“ (Protein)
<b>IDC</b>	„Invasive Ductal Carcinoma“ (Invasives ductales Karzinom)
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>kb</b>	Kilobasen(paare)
<b>KRAS</b>	„Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“ (Gen)
<b>LB</b>	„Lysogeny-Broth“ (Lysogene Brühe), auch: Luria Broth
<b>LCIS</b>	Lobuläres Carcinoma in situ
<b>Mb</b>	Megabasen(paare) (1000 bp)
<b>MDM2</b>	„Murine double minute 2“ (Gen)
<b>mRNS</b>	Boten-Ribonukleinsäure, bzw. Boten-RNS (auch mRNA, „messenger RNA“)
<b>MYC</b>	„Myelocytomatosis viral oncogene homolog“ (auch: <i>CMYC</i> ) (Gen)
<b>n</b>	„numeri“ (Anzahl)
<b>n.a.</b>	nicht auswertbar (nicht analysierbar)
<b>ORF</b>	„Open reading frame“ (Offener Leserahmen)
<b>pBAC</b>	„bacterial artificial chromosome“, auch „BAC“ (Plasmid)
<b>PCR</b>	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PE</b>	Elutionspuffer
<b>pH</b>	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration („potentia Hydrogenii“)
<b>qRT-PCR</b>	„quantitative real-time polymerase chain reaction“
<b>RBI</b>	„Retinoblastoma gene“ (Retinoblastom-Gen)
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
<b>rpm</b>	Umdrehungen bzw. Wiederholungen pro Minute („revolutions per minute“)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RZPD</b>	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
<b>s. u.</b>	siehe unten
<b>SERD</b>	„Selective Estrogen Receptor Downregulator“ (selektiver Östrogenrezeptor-Repressor)

---

<b>SERM</b>	„Selective Estrogen Receptor Modulator“ (selektiver Östrogenrezeptor-Modulator)
<b>SOD2</b>	Superoxiddismutase 2 (Gen)
<b>SSC</b>	„Sodiumchloride and Sodiumcitrate“ (Natriumchlorid und Natriumcitrat)
<b>T</b>	Thymin (Nukleinbase), auch Tiefe (Raumdimension)
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TMA</b>	„Tissue microarray“ (Gewebemikroarray)
<b>TOP2A</b>	Topoisomerase (DNA) II alpha
<b>TP53</b>	Tumorprotein 53 (Gen)
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
<b>U</b>	Einheit der Enzymaktivität („unit“)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>ü.N.</b>	über Nacht
<b>u.U.</b>	unter Umständen
<b>UICC</b>	„Union Internationale Contre le Cancer“
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>WHO</b>	„World Health Organisation“ (Weltgesundheitsorganisation)
<b>z.T.</b>	zum Teil

Maßeinheiten werden nach dem Internationalen Einheitensystem (SI = Système Internationale d'Unité) verwendet.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung des Prinzips der Aktivierung (links) der Zellproliferation.....	20
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Darstellung des Prinzips der Repression der Zellproliferation .	23
<b>Abbildung 3</b>	Schematische Darstellung einer „HSR“ auf dem kurzen Arm eines Chromosoms.....	28
<b>Abbildung 4</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Metaphase einer Blasenkrebs-Zelllinie mit einer intrachromosomalen <i>E2F3</i> -Genamplifikation vom HSR-Typ auf dem p-Arm von Chromosom 6.....	29
<b>Abbildung 5</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) einer extrachromosomalen <i>EGFR</i> -Genamplifikation .....	29
<b>Abbildung 6</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) einer intrachromosomalen <i>HER2</i> -Genamplifikation.....	30
<b>Abbildung 7</b>	Schematische Darstellung somatischer Rekombination. ....	32
<b>Abbildung 8</b>	Schematische Darstellung des „Breakage-Fusion-Bridge“-Mechanismus. ....	34
<b>Abbildung 9</b>	Schematische Darstellung des Replikationsgabelmechanismus. ....	36
<b>Abbildung 10</b>	Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	39
<b>Abbildung 11</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) von Interphasezellkernen (blau) mit normaler Genkopiezahl (links) des Gens <i>HER2</i> (rot), mit <i>HER2</i> -Genamplifikation (rechts) und dem Zentromer des Chromosoms 17 als Referenz.....	40
<b>Abbildung 12</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) von Interphasezellkernen vier verschiedener Mammatumore mit <i>ESR1</i> -Kopiezahlzugewinn.....	41
<b>Abbildung 13 a)</b>	Schematischer Ablauf einer CGH-Analyse. ....	43
<b>Abbildung 14</b>	Schematischer Aufbau eines Genchips und die Schematische Darstellung der Signalentstehung.....	45
<b>Abbildung 15</b>	Kurvendiagramm einer qRT-PCR.....	46
<b>Abbildung 16</b>	SNP-Segmentprofil einer Genchip-Analyse. ....	49
<b>Abbildung 17</b>	Visualisierung der Affymetrix-Genchip-Daten bzgl. der beiden genannten Algorithmen.....	49
<b>Abbildung 18</b>	Übersicht über den „ <i>ESR1</i> -Amplifikations-Kartierungs-TMA“ .....	55
<b>Abbildung 19</b>	Vergrößerte Darstellung eines „Gewebspots“ des <i>ESR1</i> -Mapping TMA.....	55
<b>Abbildung 20</b>	Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von <i>ESR1</i> -amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Mammakarzinome.....	69

<b>Abbildung 21</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen (100×) eines histologischen Dünnschnitts (4 µm) einer TMA-Gewebeprobe (Ø 0,6 mm) eines Mammatumors vor und nach der Mikrodissektion.....	73
<b>Abbildung 22</b> Relation der <i>ESR1</i> -Amplifikation zur ER-Überexpression. Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon.....	93
<b>Abbildung 23</b> Durchlichtmikroskopische Aufnahme (100×) eines immunhistologisch gefärbten Dünnschnitts.....	93
<b>Abbildung 24</b> Größe und Position der <i>ESR1</i> -Amplikons in den 24 kartierten Brusttumorproben.....	97
<b>Abbildung 25</b> Exemplarische Darstellung der Kartierung des Tumors entsprechend Koordinate 2h.....	98
<b>Abbildung 26</b> Foto des Gelelektrophoresegels zur Kontrolle des PCR-Produkts der PCR zur Überprüfung der pBAC-DNS des Klons RP11-450 E24.....	99
<b>Abbildung 27</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. <i>ESR2</i> als Referenz.....	102
<b>Abbildung 28</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. <i>SOD2</i> als Referenz.....	102
<b>Abbildung 29</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. <i>ESR2</i> als Referenz.....	104
<b>Abbildung 30</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. <i>SOD2</i> als Referenz.....	104
<b>Abbildung 31</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. <i>SOD2</i> als Referenz.....	107
<b>Abbildung 32</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. <i>ASXL2</i> als Referenz.....	107
<b>Abbildung 33</b> Box-Plot für die Ratios der <i>ESR1</i> -qPCR bzgl. des Referenzgens <i>ASXL2</i> (Median N = 1).....	108
<b>Abbildung 34</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. <i>SOD2</i> als Referenz.....	109
<b>Abbildung 35</b> Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. <i>ASXL2</i> als Referenz.....	109
<b>Abbildung 36</b> Einfluß des <i>ESR1</i> -Amplifikationsstatus und des ER-Expressionsstatus auf das Überleben bei Patientinnen mit Tamoxifen-Monotherapie.....	111
<b>Abbildung 37</b> Einfluß der <i>ESR1</i> -Amplifikation auf das Patientinnenüberleben im Vergleich zu verschiedenen ER-Expressionsniveaus.....	111
<b>Abbildung 38</b> Einfluß der <i>ESR1</i> -Kopiezahl auf das Patientinnenüberleben.....	112

---

<b>Abbildung 39</b> Prognostische Aussagekraft des Grades der ER-Expression ( <b>a</b> ), der <i>ESRI</i> -Kopiezahl ( <b>b</b> ), FIGO-Stadium ( <b>c</b> ) und histologischem Grad ( <b>d</b> ) bei den untersuchten Endometriumkarzinomen. ....	116
<b>Abbildung 40</b> Beispiele von Endometriumkarzinomen (a - c), komplexen endometrialen Hyperplasien mit Atypien (d - f) und komplexen endometrialen Hyperplasien ohne Atypien (g - i) .....	117
<b>Abbildung 41</b> Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von <i>ESRI</i> -amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Endometriumkarzinome. ....	117
<b>Abbildung 42</b> Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von <i>ESRI</i> -amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Ovarialkarzinome. ....	119
<b>Abbildung 43</b> Kaplan-Meier Überlebenskurven der of ERpostiven und ER-negativen Ovarialkarzinome. ....	119
<b>Abbildung 44</b> Lichtmikroskopische Aufnahmen (100×) histologischer Dünnschnitte (4 µm) von TMA-Gewebeproben (Ø 0,6 mm) zweier Ovarialtumore.....	120
<b>Abbildung 45</b> Auswirkung von kontaminierenden Zellen ohne Genamplifikation in einem Tumor mit Genamplifikation geringer Kopiezahl auf die Verlässlichkeit der Nachweisbarkeit von Genkopiezahlerhöhungen .....	151
<b>Abbildung 46</b> Schematische Darstellung der Infiltration von Tumorgewebe mit Immunzellen. ....	151
<b>Abbildung 47</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) von Interphasezellkernen (blau) eines Brusttumoreals (blau) mit hetrogener Verteilung der <i>ESRI</i> -Amplifizierten Tumorzellen.....	152
<b>Abbildung 48</b> Graphische Übersicht über die verschiedenen, in der Literatur publizierten Raten von erhöhten <i>ESRI</i> -Kopiezahlen (Amplifikation + „gain“) beim Mammakarzinom .....	158
<b>Abbildung 49</b> Graphische Übersicht über die verschiedenen, in der Literatur publizierten <i>ESRI</i> -Amplifikationsraten (nur Amplifikationen ohne „gain“) beim Mammakarzinom .....	158

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> DNS-Sequenzen der TaqMan-Primer der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“ .....	86
<b>Tabelle 2</b> DNS-Sequenzen der TaqMan-Reportersonden der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“ .....	86
<b>Tabelle 3</b> Prävalenz der <i>ESR1</i> -Kopiezahlvermehrungen in normalem und prämaligem Gewebe .....	91
<b>Tabelle 4</b> Vergleich von <i>ESR1</i> -Amplifikation und ER-Immunhistochemie .....	92
<b>Tabelle 5</b> Reproduzierbarkeit der FISH-Analyse .....	95
<b>Tabelle 6</b> Ratios des qRT-PCR-Experiments mit den Proben aus dem „Amplifikations-Test-TMA“ sowie <i>ESR2</i> und <i>SOD2</i> als Referenz.....	101
<b>Tabelle 7</b> Ratios des qRT-PCR-Experiments mit den Proben des alternativen Gewebekollektivs sowie <i>SOD2</i> und <i>ASXL2</i> als Referenz .....	106
<b>Tabelle 8</b> Einfluß verschiedener potentieller prognostischer Faktoren auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten (Cox-Regression). .....	113
<b>Tabelle 9</b> Zusammenhang zwischen <i>ESR1</i> -Amplifikation und ER-Expression in Tumoren ( $p = 0.0036$ ) und Hyperplasien ( $p = 0.0816$ ) des Endometriums .....	116
<b>Tabelle 10</b> Verwendete pBAC-Klone.....	A1
<b>Tabelle 11</b> Zusammenhang zwischen ER-Expression und der Art des Mammakarzinoms ...	A3
<b>Tabelle 12</b> Zusammenhang zwischen erhöhter <i>ESR1</i> -Kopiezahl und der Art des Mammakarzinoms .....	A4
<b>Tabelle 13</b> ER-Expression in Tumoren des Endometriums und endometroiden Hyperplasien .....	A5
<b>Tabelle 14</b> <i>ESR1</i> -Amplifikationen in Tumoren des Endometriums und endometroiden Hyperplasien.....	A6
<b>Tabelle 15</b> Zusammenhang zwischen den histopathologischen Daten des ovariellen Karzinoms, der ER-Expression und der <i>ESR1</i> -Amplifikation. ....	A7
<b>Tabelle 16</b> <i>ESR1</i> -Amplifikationen in der Literatur (Brustkrebs).....	A8
<b>Tabelle 17</b> <i>ESR1</i> -Amplifikationen in der Literatur (Krebs des Endometriums und des Ovars) .....	A11

# 1 Einleitung

## 1.1 Gynäkologische Tumore

### 1.1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist mit fast viereinhalb Millionen erkrankten Frauen die weltweit am häufigsten auftretende Krebsart und stellt nach internationalen statistischen Erhebungen für das Jahr 2002 bzw. 2004 mit mehr als 400.000 Todesfällen weltweit die, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, bei Frauen häufigste Todesursache dar (Parkin, Bray et al. 2005; WHO 2009; Ferlay, Shin et al. 2010). Dabei bleibt die Tendenz steigend. Nach Schätzungen der „American Cancer Society“ (Garcia 2007) beträgt die Anzahl der Todesfälle für das Jahr 2007 über 450.000. Die Zahl der Neuerkrankungen betrug im Jahr 2002 über 1,15 Millionen weltweit. Ähnlich dem westeuropäischen Durchschnitt, erkrankt in Deutschland ungefähr jede zehnte Frau an Brustkrebs. In etwa 5 % der Fälle liegt der Erkrankung eine erbliche Prädisposition zugrunde. Wobei in 90 % dieser Fälle Mutationen in den Genen *BRCA-1* oder *BRCA-2*, zwei Tumorsuppressorgenen, die an DNS-Reparaturvorgängen beteiligt sind, nachgewiesen werden konnten. Bei Frauen im Alter zwischen 35 und 55 Jahren ist Brustkrebs die häufigste Todesursache überhaupt. Dabei steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken mit zunehmendem Alter kontinuierlich an (Breckwoldt, Kaufmann et al. 2008).

Die Tumorentwicklung kann hierbei von allen Geweben der Brust ausgehen, jedoch handelt es sich meist um Karzinome, welche vom Epithel des Milchgangs (Ductus) oder der Milchdrüse (Lobulus) ausgehen. Karzinome der Brust werden nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auch in invasive (Krebs) und nicht invasive Tumore unterteilt. Für die nicht invasiven Karzinome, welche also „in situ“ bleiben, ergeben sich so die Unterteilungen Ductales bzw. Lobuläres Carcinoma in situ (DCIS und LCIS) als die beiden Haupttypen. Hierbei kommen die DCIS wesentlich häufiger als die LCIS vor.

Zwar werden LCIS und daraus entstandene Karzinome aufgrund ihrer Wuchsform später entdeckt als die duktales Entartungen, jedoch entwickeln sie sich seltener zu invasiven Karzinomen, so daß mit ca. 40-75 % der Brusttumore bzw. bis zu 80 % der Mammakarzinome der bei weitem häufigste Tumortyp das invasive duktales Karzinom (IDC) ist (Breckwoldt, Kaufmann et al. 2008).

Dabei ist die Überlebensrate bei Brustkrebs im Vergleich zu anderen Tumorentitäten jedoch verhältnismäßig hoch (Parkin, Bray et al. 2005). Im Jahre 2002 beispielsweise hatten 4,4 Millionen Frauen die Brustkrebsdiagnose bereits um fünf Jahre überlebt. Dies spricht auch für

den Erfolg und Sinn von derzeit bei der Brustkrebstherapie etablierten zytostatischen bzw. hormonellen (neo-) adjuvanten Therapiemöglichkeiten, die eine 20 - 30 %ige Verminderung der Mortalität bewirken können (Allred and Swanson 2000; Allred, Mohsin et al. 2001). Die Therapie von Brustkrebs besteht im allgemeinen aus den drei Komponenten: Operation, Bestrahlung und der Behandlung mit Medikamenten, wie z. B. der Chemotherapie, der Hormontherapie (z.B. Tamoxifen) oder auch einer Therapie mit Antikörpern (z.B. Herceptin). Wie die meisten malignen Krebserkrankungen wird auch der Brustkrebs in der Regel zunächst durch die Operation, also der chirurgischen Entfernung des Tumors behandelt (Kreienberg, Kopp et al. 2008). Dabei ist Erfolg und Art einer anschließenden Therapie, wie Bestrahlung und vor allem der medikamentösen Behandlung, stark von den molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors abhängig, die sehr verschieden sein können. Diese zu verstehen und diagnostizieren zu können, ist daher eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen und gezielten therapeutischen Einsatz. So sollten und könnten die Therapien in Art und Umfang der entsprechenden molekulargenetischen Konstitution des Tumors angepaßt und damit die Erfolgsaussicht verbessert werden. Dies ist nicht zuletzt auch aufgrund der toxischen Nebenwirkungen, wie etwa der Chemotherapie, wichtig, welche sich durch eine Spezifizierung der Behandlung reduzieren lassen könnten (siehe auch Kapitel 1.2.2.1).

### **1.1.2 Das Endometriumkarzinom**

Das Endometriumkarzinom ist nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste gynäkologische Malignität in den Industrienationen. In der EU ist sie verantwortlich für über 8 % der Krebserkrankungen bei Frauen, mit einer Gesamthäufigkeit von 28,3 Fällen auf 100.000 Frauen pro Jahr und einer Sterblichkeitsrate von 6,8 Fällen auf 100.000 Frauen pro Jahr (Ferlay, Autier et al. 2007).

Endometriumkarzinome bestehen aus biologisch und histologisch unterschiedlichen Gruppen von Neoplasien, welche alle durch eine unterschiedliche Parthenogenese charakterisiert sind. Östrogenabhängige Karzinome (Typ I) machen den größten Teil (> 90 %) der Tumore aus. Sie sind typischerweise niedrigen Tumorgrades, also gut oder mittelgradig differenziert und überwiegend vom endometroiden Typ. Patientinnen mit dieser Form von Krebs sind häufig übergewichtig, kinderlos oder haben eine späte Menopause. Endometriumkarzinome des Typs I sind häufig mit Endometriumhyperplasien und im Besonderen mit atypischen Hyperplasien assoziiert. Der zweite Typ (Typ II) der Endometriumkarzinome tritt bei älteren postmenopausalen Frauen auf. Diese Tumore sind normalerweise hohen Grades und zu ihnen

gehören meist seröse oder Klarzell-Subtypen. Typ II Tumore sind weniger östrogenresponsiv als Typ I Karzinome (Kurman 2002; Silverberg, Kurman et al. 2003). Endometriumkarzinome werden zudem nach der FIGO-Klassifikation in vier Stadien (I – IV) von entsprechend zunehmend fortgeschrittener Ausbreitung des Tumors eingeteilt.

Die wirkungsvollste Therapie des Endometriumkarzinoms ist die Operation. Dabei wird der Tumor und die gesamte Gebärmutter vollständig entfernt. Abhängig vom Tumorstadium wird auch zusätzlich oder alternativ (wenn der Tumor inoperabel ist) eine Strahlentherapie angewandt. Ebenfalls abhängig von den Stadien kann auch eine Chemotherapie (Zytostatika) angezeigt sein. Obwohl im Endometrium Steroidrezeptoren ausgeprägt exprimiert (Kapitel 1.2.2.2) und funktionell aktiv sind (Bergeron, Ferenczy et al. 1988; Thigpen, Brady et al. 2001; Silverberg, Kurman et al. 2003; Jeon, Park et al. 2006), erweisen sich sowohl Hormon- als auch Antihormontherapien beim Endometriumkarzinom als nicht erfolgreich. Tamoxifen wirkt u.a. sogar auch als Risikofaktor für Entstehung und Progression des Endometriumkarzinoms. Aromataseinhibitoren gelten als wirkungslos, schlecht untersucht und umstritten (Leidenberger 2009). Auch eine Therapie mit Gestagenen wird weitgehend als wirkungslos angesehen, wird jedoch in bestimmten indizierten Fällen versuchsweise palliativ und auch bei einfachen Hyperplasien eingesetzt (DKG 2010) (siehe auch Kapitel 1.2.2.2).

### **1.1.3 Das Ovarialkarzinom**

Weltweit ist die Krebserkrankung der Eierstöcke der fünfthäufigste bösartige Tumor bei der Frau und die häufigste Todesursache beim Krebs des Fortpflanzungssystems (Kurman 2002). Auch hier erhöht die genetische Prädisposition durch Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* die Wahrscheinlichkeit an dieser Art Krebs zu erkranken wesentlich (Breckwoldt, Kaufmann et al. 2008). Die Prognose dieser Krebserkrankung ist im Allgemeinen schlecht, da sie oft im späten Stadium entdeckt wird. Das mittlere Gesamtüberleben dieser Patientinnen liegt bei 24 bis 38 Monaten nach der Diagnose (Smyth, Gourley et al. 2007).

Die Behandlungsmöglichkeiten umfassen die chirurgische Entfernung des Tumors und eine maximale Reduzierung des befallenen Bauchfells im Falle einer lokalen Ausbreitung des Tumors. Zudem wird mit einer topischen und systemischen Chemotherapie behandelt.

Obwohl der Östrogenrezeptor (ER) in Ovarialkarzinomen häufig exprimiert ist, spielen endokrine Therapien hier nur eine untergeordnete Rolle (siehe Kapitel 1.2.2.3).

## 1.2 Molekulargenetische Grundlagen

### 1.2.1 Allgemeine Molekulargenetik maligner Tumoren

Tumorerkrankungen entstehen generell als Folge von genetischen Veränderungen der betreffenden Zellen. Dabei wird davon ausgegangen, daß ein Tumor aus einer einzigen Zelle entsteht, in der es zu einer bzw. mehreren initialen genetischen Veränderungen kommt, mit Hilfe derer die entsprechende Zelle einer natürlichen Wachstumskontrolle entgeht. Im Laufe der Tumorgenese kommen in den daraus neu entstehenden Zellen weitere Veränderungen hinzu, so daß schließlich eine oder mehrere Zellen vorhanden sind, welche die genetischen Voraussetzungen zur malignen Entartung besitzen. Diese Mutationen, die für die maligne Entartung eines Zellklons nötig sind, werden dabei meist nach und nach über einen gewissen Zeitraum erworben (Coleman and Tsongalis 2001).

Für eine sich im Verlauf der Zeit ergebende Anhäufung von Mutationen, die schließlich zum malignen Tumor führen, spricht auch, daß die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken mit fortgeschrittenem Alter steigt. Man geht beispielsweise davon aus, daß sich über 80 % der kolorektalen Karzinome basierend auf zuvor bestehenden Adenomen, d.h. präkanzerösen Läsionen der Dickdarmschleimhaut, entwickeln. So konnte nachgewiesen werden, daß die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom aufeinander folgend mit verschiedenen genetischen Veränderungen einhergeht (Cho and Vogelstein 1992). Dabei sind in dieser Entwicklung von der gesunden Dickdarmschleimhaut über das Adenom zum Karzinom auf genetischer Ebene z.B. die vier Gene *APC*, *TP53*, *KRAS* und *DCC* beteiligt (Goyette, Cho et al. 1992).

In seinem Charakter und Verhalten wird das Tumorgewebe deshalb einerseits durch seine normalen, genetisch bedingten und gewebespezifischen Eigenschaften sowie andererseits durch die neu erworbenen, molekularpathologisch-genetischen Veränderungen (Mutationen) bestimmt, welche gleichzeitig auch die Ursachen seiner Entstehung und Entwicklung aus den einzelnen betroffenen Zellen darstellen können.

Diese Mutationen können ganz verschiedener Natur sein. Es kann sich sowohl um Mutationsformen auf der subchromosomalen Ebene der DNS-Sequenz, als auch auf chromosomaler Ebene, wie z.B. Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen handeln.

Auf DNS-Ebene unterscheidet man Punktmutationen (Austausch einer Base gegen eine andere), Deletionen (Verlust einer oder mehrerer Basen), Insertionen (der zusätzliche Einbau einer oder mehrerer Basen in die DNS-Sequenz), Duplikationen (Verdopplung eines Gens oder Sequenzen eines Gens) und Amplifikationen (Vermehrung eines Gens oder eines ganzen

Chromosomenabschnitts). In solchen Fällen, in denen ganze Chromosomen oder Abschnitte von Chromosomen betroffen sind, spricht man von Chromosomenmutationen.

DNS- bzw. Genmutationen haben verschiedenste Ursachen. Sie können durch zelluläre Fehler bei der DNS-Replikation und der Zellteilung (Spontanmutation), als auch direkt durch äußere Einflüsse, wie z.B. Strahlung oder Toxine, entstehen.

Es ist davon auszugehen, daß immer mehrere genetische Veränderungen miteinander einhergehen müssen, damit eine Zelle unkontrolliert oder sogar maligne (invasiv bzgl. des umgebenden Gewebes) proliferiert. Diese genetischen Veränderungen akkumulieren sich im Laufe der Zeit bis zur Tumorentstehung und können z.T. auch schon von vorherigen Generationen geerbt worden sein.

Für die Krebsentstehung sind solche Mutationen dann relevant, wenn sie die Aktivität von solchen Genen (sogenannte Protoonkogene) verstärken, welche durch ihre (übermäßige) Aktivierung die Zellproliferation stimulieren oder die Funktion von Tumorsuppressorgenen abschwächen oder ausschalten, welche durch Verlust oder Hemmung ihrer Funktion zu einer entarteten Proliferation oder malignen Transformation beitragen.

Protoonkogene werden daher durch solche Mutationen, welche die Stimulation der Zellproliferation oder das Verhindern von deren Hemmung bewirken, zu Onkogenen. Hierbei handelt sich häufig um Gene von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren bzw. Gene, welche die Hemmung des Zellzyklus oder den programmierten Zelltod verhindern (Alberts 1997). Diese Gene werden häufig durch die Mutation genetischer Elemente, welche durch die genetische Veränderung direkt oder indirekt die Transkription stimulieren, verstärkt aktiviert.

Wichtige Protoonkogene, welche eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus einnehmen, sind z.B. *CCND1* (Moreno-Bueno, Rodriguez-Perales et al. 2003; Elsheikh, Green et al. 2008) oder *MDM2* (Oliner, Kinzler et al. 1992; Oliner, Pietenpol et al. 1993; Zhang, Liu et al. 2011). Auch das Gen *BCL2* spielt hier bei Lymphomen eine Rolle, da es den programmierten Zelltod (Apoptose) hemmt (Butturini and Gale 1990; Kramer, Hermans et al. 1998).

Wichtige Protoonkogene vom Typ des Transkriptions- bzw. Wachstumsfaktors oder deren Rezeptoren sind z.B. Gene wie *MET* (Rong, Oskarsson et al. 1993; Jeffers, Rong et al. 1996; Chiara, Michieli et al. 2003), *MYC* besonders beim Burkitt-Lymphom (Butturini and Gale 1990; Kramer, Hermans et al. 1998), *ERBB2* bzw. *HER2* vor allem beim Mammakarzinom (Slamon, Clark et al. 1987) oder das *EGFR* beim Glioblastom (Mischel, Shai et al. 2003; Shinojima, Tada et al. 2003).

Tumorsuppressorgene dagegen sind solche Gene, welche in der gesunden Zelle eine den Zellzyklus oder andere zur Krebsentstehung wichtige Funktion hemmend regulierende Funktion ausüben. Tumorsuppressorgene werden meist durch Verlust bzw. Mutation funktionsunfähig, aber auch fehlende oder ausgefallene Steuerungselemente bzw. -Faktoren dieser Gene sind als Gründe für Ihren Ausfall vorstellbar. So ist die durch Mutation entstandene Funktionsuntüchtigkeit des Tumorsuppressorgens TP53 eine häufige Veränderung in Tumoren. Das durch TP53 kodierte Protein p53, das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, kann einerseits DNS-Reparatur-Mechanismen in Gang setzen und andererseits den Zellzyklus stoppen oder bei zu starken Zellschäden sogar dazu beitragen, den programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen und so einer Tumorentwicklung entgegenwirken (Lane 1992; Alberts 1997; Stiewe 2007). Eine durch die hohe Proliferationsrate beschleunigte Zellalterung und ein entsprechend früher Zelltod wird bei normalen somatischen Zellen auch durch die bei jeder Zellteilung erfolgende Verkürzung der Telomere verursacht. Hierbei sind schließlich auch die codierenden Bereiche der Chromosomen betroffen. Dieser Vorgang würde so ebenfalls eine natürliche Hemmung des Tumorwachstums darstellen. Doch können Tumore auch diese Schranke durch die Aktivierung des Enzyms Telomerase umgehen, welches die Telomere wieder verlängern kann. So werden sechs Kennzeichen für Krebszellen als funktionell typisch angesehen: unkontrollierte, verselbstständigte Wachstumssignale, Unempfindlichkeit für das Wachstum hemmende Signale, Umgehung der Apoptose, unbegrenztes replikatives Potential (Telomeraseaktivität), Aufrechterhaltung der Angiogenese (zur Nähr- und Sauerstoffversorgung der Tumorzellen) und die Fähigkeit zur Invasion umliegendes Gewebes (Hanahan and Weinberg 2000).

Eine wichtige genetische Veränderung bei der Tumorentstehung, welche zur Transformation von Protoonkogenen zu Onkogenen führen kann, ist die oben bereits erwähnte Vermehrung der Kopiezahl des entsprechenden Gens (Albertson 2006). Durch solche Genamplifikationen wird das Gen aufgrund der höheren Kopiezahl auf DNS-Ebene auch in höherer Kopiezahl auf mRNA-Ebene vermehrt transkribiert.

Bei der Krebsentstehung in den verschiedenen Gewebetypen können naturgemäß solche Gene und entsprechende molekulare Mechanismen eine besondere Rolle spielen, welche auch im entsprechenden gesunden Gewebe eine wichtige Rolle bei der Proliferation oder anderen Aktivitäten der Zellen, welche bei der malignen Transformation wichtig sind, einnehmen.

Es sind verschiedene molekulargenetische und biochemische Mechanismen und Signalwege bekannt, die bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Brustkrebs relevant sind.

## **1.2.2 Bedeutung des Östrogenrezeptors für die Entstehung maligner gynäkologischer Tumore**

Einer der bekanntesten und zur Zeit auch bei der Therapie wohl wichtigsten Mechanismen bei der Entstehung gynäkologischer Tumore ist der des Östrogenrezeptors-alpha (ER-alpha, ER- $\alpha$ , oder auch nur ER), ein Protein, durch das in östrogenresponsiven Geweben die Aktivität von hunderten Genen gesteuert werden kann (Pedram, Razandi et al. 2002).

Das weibliche Geschlechtshormon Östrogen, der aktivierende Ligand des Östrogenrezeptors, nimmt neben dem menschlichen Gehirn naturgemäß vor allem auch in spezifisch weiblichen Geweben eine bedeutende Rolle ein. Es wird vor allem in den Ovarien, aber auch im Fettgewebe durch die Aromatisierung von Androgenen gebildet (Korach 1996) und reguliert im ganzen Körper Wachstum, Differenzierung und Funktion von verschiedenen Geweben, Vor allem bzgl. der Entstehung geschlechtsspezifischer Geweben wie den Eierstöcken (Ovarien), der Gebärmutter (Endometrium) und der weiblichen Brust (Mamma) ist dieses Hormon essentiell (Katzenellenbogen 1996). Östrogen übt diese Funktionen aus, indem es an spezifische Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren, bindet.

Durch die Bindung des weiblichen Sexualhormons Östrogen an den Östrogenrezeptor (ER) im Zellkern wird dieser phosphoryliert. Der phosphorylierte Rezeptor dimerisiert und wird damit für die Bindung an die Ziel-DNS aktiviert. Hier fungiert das Rezeptordimer als Transkriptionsfaktor, welcher bestimmte Zielgene aktiviert, deren Funktionen für die Proliferation der Zelle verantwortlich sind (Parker, Arbuckle et al. 1993).

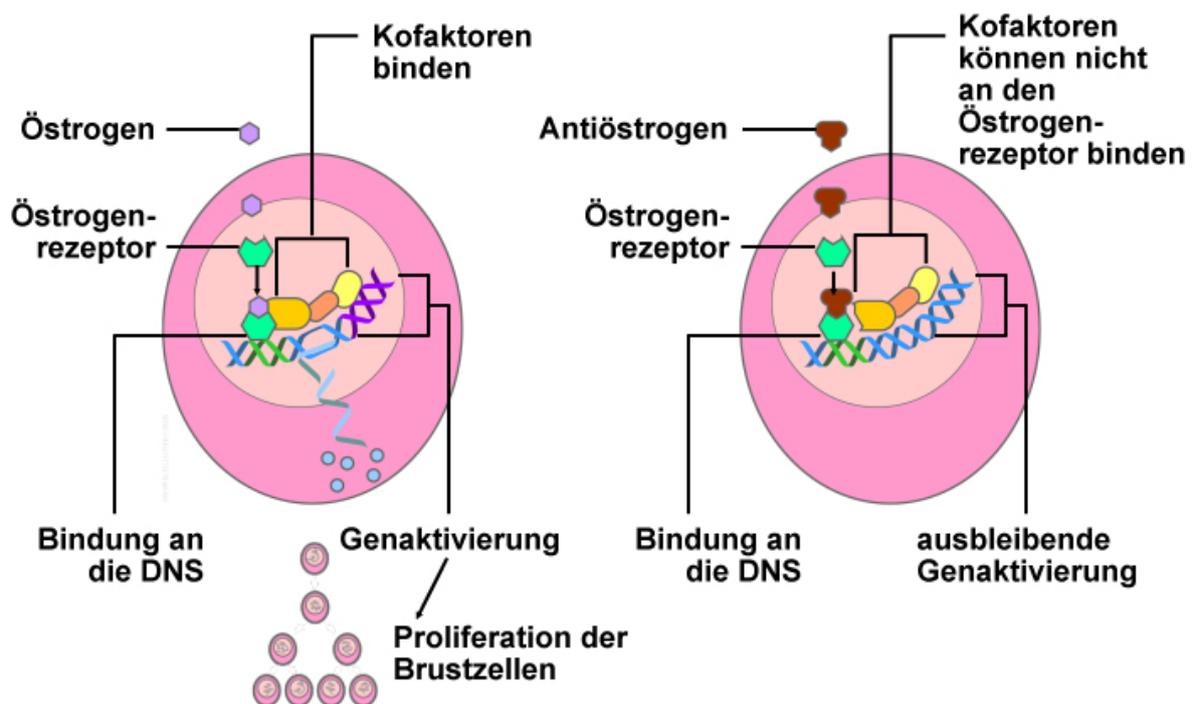
Beim Menschen kommt neben dem ER-alpha noch eine weitere Isoform des Östrogenrezeptors (ER) vor, der Östrogenrezeptor-beta (ER-beta oder ER- $\beta$ ). Er wird von einem anderen Gen kodiert und zeigt ein anderes Expressionsmuster als der ER-alpha.

Über die Funktion und klinische Bedeutung von ER-beta ist im Vergleich zu ER-alpha wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß ER-beta in seiner Funktion der von ER-alpha entgegenwirkt und so auch zu einer Inhibierung der ER-alpha vermittelten östrogenstimulierten Proliferation führen könnte (Omoto, Eguchi et al. 2003). Ein weiterer Östrogenrezeptor, der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor 1 (GPER) auch G-Protein gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30) genannt, spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Tamoxifen-Resistenzen bei Brustkrebs (Ignatov, Ignatov et al. 2010).

In seiner Eigenschaft als Wachstumsfaktor stellt der Östrogenrezeptor-alpha für geschlechtsspezifisch weibliche Gewebe eine naturgemäß bedeutende Rolle dar. So ist die molekulargenetische und biochemische Konstitution dieser Gewebe bzgl. der

Empfänglichkeit für Wachstumssignale über den ER-Signalweg besonders prädestiniert. Der ER hat daher eine zentrale Funktion in der Regulation der Physiologie von Brustdrüsengewebe und Endometrium. Dabei wird die Wirkung der Östrogene über verschiedene Östrogenrezeptor-Isoformen und -Isotypen vermittelt. So überwiegt im Brustdrüsengewebe und im Endometrium die Expression des ER-alpha, während im Ovar bevorzugt der ER-beta exprimiert wird (Marsigliante, Muscella et al. 1995; Brandenberger, Lebovic et al. 1999; Hanstein, Beckmann et al. 2002). Aufgrund seiner genaktivierenden und die Zellproliferation steuernden Eigenschaften ist die Regulation der Expression des ER selbst von großem Interesse. Dabei scheinen die Regulationsvorgänge im biochemischen Haushalt der Zelle komplexen Mechanismen zu unterliegen, die verschiedenartig zur Ausprägung kommen können (Freiss, Prebois et al. 1993; Martin, Saceda et al. 1993; Miyoshi, Murase et al. 2010 ).

Bzgl. der klinischen Bedeutung des ER nimmt das Mammakarzinom eine besonders herausragende Stellung ein.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Prinzips der Aktivierung (links) der Zellproliferation durch den Östrogenrezeptor bzw. der Repression der Zellproliferation durch die Blockade des Rezeptors mit einem Antiöstrogen am Beispiel der weiblichen Brust. Grafik des „National Cancer Institut“ der USA, modifiziert.

### 1.2.2.1 Bedeutung für das Mammakarzinom

Der erste Zusammenhang zwischen Brustkrebs und dem Hormon Östrogen bzw. seinem Rezeptor (ER) wurde im Jahre 1896 von dem britischen Chirurgen Beatson entdeckt. Beatson beobachtete, daß die Entfernung der Ovarien bei prämenopausalen Frauen mit Mammatumoren zu einem Rückgang des Tumors führen konnte (Beatson 1896). Allerdings war Beatson das Hormon Östrogen selbst noch nicht bekannt, dessen Existenz und karzinogenes Potential erst 30 Jahre später in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen wurde (Lacassagne 1932).

Mehr als zwei Drittel aller Mammakarzinome weisen zum Zeitpunkt ihrer Diagnostizierung eine Expression von ER-alpha auf (Stierer, Rosen et al. 1993). Hierdurch stellt der ER-alpha-Rezeptor, als ein ausgewiesener Bestandteil wichtiger Signalwege bei der Zellproliferation des Brustgewebes, eines der wichtigsten therapeutischen Ziele beim Mammakarzinom dar (Sunderland and Osborne 1991).

Um die ER-exprimierenden Karzinome für eine Therapie zu identifizieren, werden Mammakarzinome daher routinemäßig immunhistochemisch auf ihre ER-Expression (ER-Positivität) hin untersucht (Andersen and Poulsen 1989).

Die erste, heute gängigste und bekannteste Therapie beruht auf der Blockade des Rezeptors selbst. Hierbei werden als Therapeutikum Moleküle eingesetzt, die dem natürlichen Liganden Östrogen ähneln. Diese Liganden binden daher an den Rezeptor, ohne ihn aber zu aktivieren. Bei dieser kompetitiven Hemmung wird der Rezeptor blockiert und steht als aktivierender Transkriptionsfaktor nicht mehr zur Verfügung. Diese Moleküle gehören zu den selektiven Östrogenrezeptor blockierenden Modulatoren, sogenannten SERMs („Selective Estrogen Receptor Modulating Molecules“).

Das älteste, bekannteste und immer noch am häufigsten eingesetzte Therapeutikum dieser Art ist Tamoxifen, welches seit über 30 Jahren zur Anti-ER-Therapie eingesetzt wird. Obwohl es heute andere Medikamente gibt, vor allem die Aromatasehemmer, welche die körpereigene biochemische Synthese des Östrogens, des Liganden des Östrogenrezeptors, blockieren, stellt Tamoxifen somit immer noch den Prototypen eines endokrinen Therapeutikums dar.

Die Therapie mit Tamoxifen birgt jedoch immer die Gefahr einer östrogenagonistischen Wirkung, da Tamoxifen mit seinen sterischen Bindungseigenschaften Östrogen imitiert. Vor allem in endometrialem Gewebe kann es den ER nicht nur binden und ihn blockieren, sondern auch in eine aktive Form transformieren. Eine relativ häufige Nebenwirkung von Tamoxifen ist folgend ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome (Ferguson, Soslow et al. 2006).

Zudem treten häufig auch Tamoxifen-Resistenzen auf, welche sich während der Therapie entwickeln können, oftmals aber schon vorher vorhanden sind (Dorssers, Van der Flier et al. 2001).

Daher sind im Laufe der Zeit neue Medikamente zur endokrinen Anti-ER-Therapie entwickelt worden. Dazu gehören sowohl andere SERMs, die von ihrer Struktur her dem Tamoxifen ähneln (z.B. Toremifen, Droloxifen), als auch SERMs, die sich in Ihrer Struktur vom Tamoxifen unterscheiden (z.B. Raloxifen). Ihnen gemeinsam ist, daß sie sterische Eigenschaften besitzen, mit denen sie die Bindungstellen des Östrogens an den ER besetzen, sie blockieren und u.U. den ER jedoch auch aktivieren können.

Es sind aber auch Therapeutika entwickelt worden, die nicht nur an den ER binden, sondern dadurch auch seinen Abbau beschleunigen. Dadurch ist der ER nicht mehr als Transkriptionsfaktor vorhanden und eine potentiell östrogenagonistische Wirkung kann sich nicht auswirken. Diese ER-destabilisierende Substanzgruppe wird „Selective Estrogen Receptor Downregulators“ (SERDs) genannt. Zu ihnen gehört das bekannte Medikament Fulvestrant, welches eine rein östrogenantagonistische Wirkung zeigt und keine für viele SERMs bekannte Kreuzresistenz mit Tamoxifen aufweist.

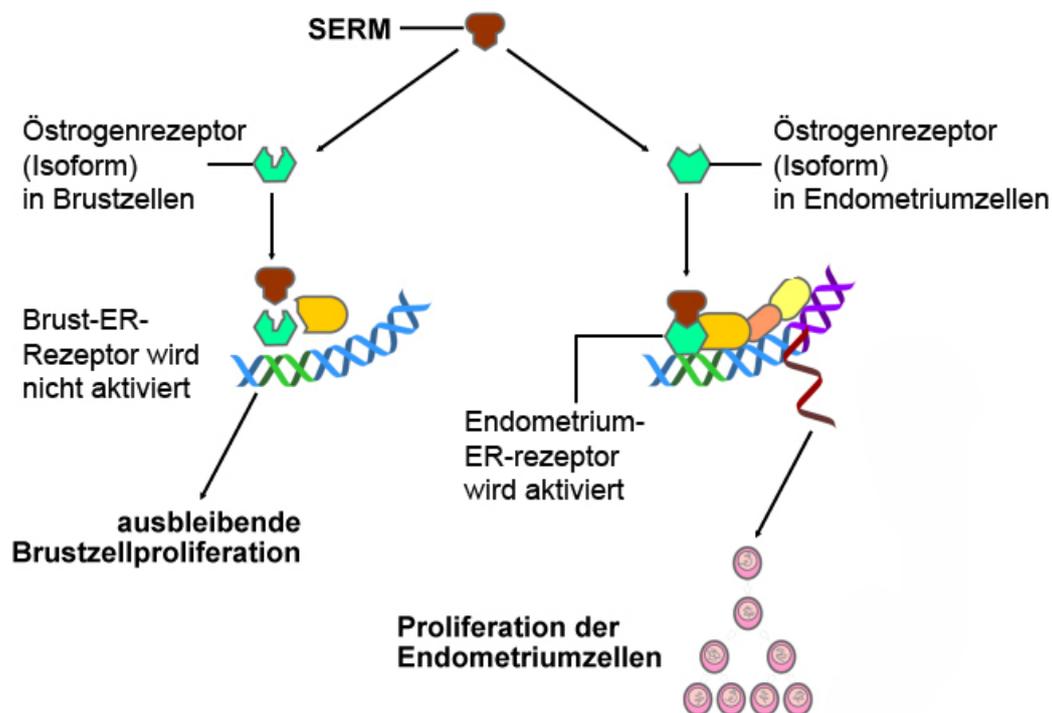
Ein ganz anderer Wirkungsmechanismus liegt den oben erwähnten, in jüngerer Zeit entwickelten und zunehmend an Bedeutung gewinnenden Aromataseinhibitoren zugrunde. Diese Stoffgruppe greift nicht am ER an, sondern an der Synthese seines natürlichen Liganden, des Östrogens.

Die Aromataseinhibitoren, auch Aromatasehemmer genannt, inhibieren das Enzym Aromatase, das in der Synthese des Östrogens die Konvertierung von Testosteron in Östrogen katalysiert. Die Medikamente Anastrozol und Exemestan gehören heute zu den bekanntesten Vertretern dieser Gruppe der endokrinen Therapeutika (Hozumi, Suemasu et al. 2011; Llombart-Cussac, Ruiz et al. 2011; Vogel 2011).

Die Bedeutung der Anti-ER-Therapie wird vor allem auch durch ihren Erfolg in der klinischen Behandlung deutlich. Sie bewirkt bei 30 - 50 % aller Brustkrebspatientinnen eine signifikante Abnahme des Tumorwachstums (Wolmark and Dunn 2001).

### 1.2.2.2 Bedeutung für das Endometriumkarzinom

Der Östrogenrezeptor-alpha (ER) spielt eine kritische, verschiedenartige und nicht vollkommen verstandene Rolle in Endometriumkarzinomen. Die meisten Endometriumkarzinome exprimieren den Östrogenrezeptor-alpha und einige dieser Tumore sprechen positiv auf eine Antiöstrogentherapie wie etwa der Tamoxifen-Therapie an (Thigpen, Brady et al. 2001; Silverberg, Kurman et al. 2003). Andererseits stellt die Tamoxifen-Therapie Östrogenrezeptor-positiver Brustkarzinome ein Hauptrisiko für die Entwicklung von Endometriumkarzinomen dar (ACOG 2006). Es ist naheliegend, daß hier in der differentiellen, variablen und heterogenen Expression verschiedener Östrogenrezeptor-Isoformen und -Isotypen (Bergeron, Ferenczy et al. 1988; Brandenberger, Lebovic et al. 1999) eine mögliche Ursache liegt (siehe auch **Abbildung 2**). Der widersprüchlichen Auswirkungen des aktivierten ER im Endometriumkarzinom entsprechen die schlechten bzw. abträglichen therapeutischen Ergebnisse der endokrinen Therapie. Im allgemeinen gelten hormonelle bzw. antihormonelle Therapien daher als nicht indiziert.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung des Prinzips der Repression der Zellproliferation durch die Blockade des Östrogenrezeptors mit einem als Antiöstrogen wirkenden SERM am Beispiel der weiblichen Brust (links) und der Aktivierung (rechts) der Zellproliferation durch des gleiche SERM-Molekül beim Endometrium. Grafik des „National Cancer Institut“ der USA.

### 1.2.2.3 Bedeutung für das Ovarialkarzinom

Die Krebserkrankung des Ovars gehört zur Gruppe der Krebsarten mit häufiger Expression von Steroidrezeptoren. In Abhängigkeit von der jeweiligen Studie, wurde eine ER-Expression in 25 % - 86 % der Ovarialtumore, mit dem höchsten Anteil in den endometrioiden und serösen Subtypen, beobachtet (Teufel, Geyer et al. 1983; Kommoss, Pfisterer et al. 1992; Cardillo, Petrangeli et al. 1998; van Doorn, Burger et al. 2000; Lindgren, Backstrom et al. 2001; Vang, Whitaker et al. 2001; Lindgren, Cajander et al. 2004; Rosen, Huang et al. 2004; Van Mieghem, Abeler et al. 2005; Vang, Gown et al. 2006; De Sousa Damiao, Fujiyama Oshima et al. 2007; Farinola, Gown et al. 2007; Hogdall, Christensen et al. 2007). Dementsprechend ist die endokrine Therapie, nach dem Scheitern der ersten und zweiten Chemotherapie, eine anerkannte Möglichkeit zur Behandlung chemoresistenter Ovarialtumore.

Jedoch sprechen nicht alle Östrogenrezeptor-positiven Ovarialtumore auf eine Antiöstrogentherapie an. Als mögliche Erklärung für diese Befunde werden die Tatsachen in Erwägung gezogen, daß die meisten Studien retrospektiv, von kleiner Fallzahl und ohne geeignete Auswahl der Patientinnen konzipiert sind und die Anwendung der hormonellen Therapie generell als letzte Therapieoption bei refraktiven oder resistenten Ovarialtumoren angewendet wird.

Tamoxifen betreffend ist es zudem nicht abschließend geklärt, ob dieses Therapeutikum im Ovarialgewebe als reiner Östrogenantagonist wirkt oder ob es auch agonistische Effekte bewirkt (Langdon, Crew et al. 1994; Clinton and Hua 1997; Makar 2000; Cunat, Hoffmann et al. 2004).

### 1.3 Genamplifikationen

Genamplifikationen sind Genkopiezahlvermehrungen. Gewöhnlich trägt eine Zelle im Zellkern zwei Allele, also zwei Kopien eines Gens, jeweils eines auf den beiden homologen Chromosomen. Das Vorhandensein weiterer Kopien des gleichen Gens wird als geringgradiger Kopiezahlzugewinn („gain“) bezeichnet, wenn das Verhältnis von Genkopiezahl zur Anzahl des zugehörigen Chromosoms in der Zelle größer eins aber kleiner zwei ist ( $\text{Ratio} > 1$  und  $< 2$ ). Genamplifikationen sind als Genkopiezahlvermehrungen definiert, bei denen die entsprechende Ratio  $\geq 2$  beträgt.

Die Länge bzw. Ausdehnung der vervielfältigten Abschnitte der chromosomalen DNS kann sich sowohl auf einzelne Gene beschränken, also relativ kurz sein, als auch über mehrere Megabasen mit entsprechend vielen Genen erstrecken.

Solche Genkopiezahlvermehrungen, hier unabhängig von der jeweiligen Ratio allgemein als Genamplifikationen bezeichnet, sind häufig die Folge genetischer Instabilität (Kapitel 1.3.2) und treten nach heutigen Erkenntnissen häufig in Krebszellen auf, während sie in gesunden menschlichen Zellen normalerweise nicht vorkommen (Albertson 2006) oder zumindest eher selten sind. Jedoch gibt es auch hier nach heutigen Stand der Genomforschung Ausnahmen. So ist im normalen menschlichen Genom das Gen für die Amylase amplifiziert (Perry, Dominy et al. 2007).

In Tumorzellen können Genamplifikationen von Genen, die bei der positiven Regulation der Zellproliferation eine Rolle spielen (Onko- bzw. Protoonkogene), der Zelle ermöglichen der natürlichen Wachstumskontrolle zu entgehen. Die in Tumoren amplifizierten Gene sind meistens solche Protoonkogene, welche häufig für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren kodieren (siehe auch Kapitel 1.2.1).

Ein solcher die Zellproliferation regulierender Rezeptor, welcher verbunden mit seinem Liganden selbst als Wachstumsfaktor fungiert, ist, wie beschrieben (Kapitel 1.2.2), der Östrogenrezeptor. Er spielt unabhängig vom Amplifikationsstatus seines Gens eine zentrale Rolle in der Therapie des Mammakarzinoms.

Seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts, bzw. seit Anfang des letzten Jahrzehnts, spielt für die Therapie des Mammakarzinoms ein anderer solcher Wachstumsfaktor-Rezeptor eine bedeutende Rolle: der *HER2*-Rezeptor (Human epidermal growth factor receptor-2).

*HER2* gehört zu einer Familie von vier Transmembranrezeptoren (Her1-Her4), welche Teil von Signaltransduktionskaskaden sind, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren.

Ein Vorteil für die Behandlung von Brustkrebs mit *HER2* als molekularem Ziel ist, daß der Rezeptor in gesunden Zellen kaum exprimiert wird, und die Behandlung somit relativ arm an Nebenwirkungen ist. Eine klinisch bedeutsame Ausnahme stellt hierbei allerdings der Herzmuskel dar (Crone, Zhao et al. 2002; Garratt, Ozcelik et al. 2003). Analog zum ER findet bei *HER2* eine Blockade des Rezeptors statt. Hierbei wird allerdings nicht der Ligand imitiert, sondern es wird an das Protein *HER2* ein monoklonaler Anti-*HER2*-Antikörper gebunden, welcher als das Therapeutikum Herceptin bekannt ist.

Der *HER2*-Rezeptor stellt deswegen einen so wichtigen Angriffspunkt bei der Krebsbehandlung dar, weil das Gen *HER2*, welches für das Protein *HER2* codiert, in Mammakarzinomen amplifiziert, also in vervielfältigter Kopiezahl, vorliegen kann. Dadurch wird die Expression des Rezeptors in den Krebszellen so stark erhöht, daß sich der durch die Aktivierung des Rezeptors in Gang gesetzte Signalweg für die Zellproliferation der natürlichen Kontrolle entzieht. Gleichzeitig kann der auf der Zelloberfläche befindliche *HER2*-Rezeptor aber auch entsprechend tumorspezifisch durch die Anti-*HER2*-Antikörper (Herceptin) angegriffen werden. So bringt, nach bisherigen Erkenntnissen, die Behandlung mit Herceptin dann Erfolg, wenn das Gen *HER2* im Tumor auch amplifiziert vorliegt.

Liegen in Tumorzellen Gene amplifiziert vor, deren Expression bzw. Überexpression einen Wachstums- oder Überlebensvorteil verleiht, sind dies also entscheidende Veränderungen im biochemischen Haushalt der Zelle für die Tumorprogression (Rubin and Yarden 2001).

Außer im Mammakarzinom sind *HER2*-Amplifikationen bzw. -Überexpressionen auch in Tumoren der Lunge (Pellegrini, Falleni et al. 2003), des Magens (Risio, De Rosa et al. 2003), des Darms (Marx, Burandt et al. 2011), des Ovars (Mayr, Kanitz et al. 2006) und oralen Tumoren (Cornolti, Ungari et al. 2007) gefunden worden.

Durch die Genamplifikation solch eines Rezeptors von Wachstumsfaktoren wird also die Wirkungsintensität dieser Komponenten in der Signalkaskade so verstärkt, daß die normalen Kontrollmechanismen der Zelle unterlaufen werden und damit die Zellproliferation und Tumorprogression stark begünstigt wird.

Die *HER2*-Amplifikation findet sich in 20 - 30 % aller Mammakarzinome (Pauletti, Godolphin et al. 1996) und ist mit einem aggressiven Tumorverhalten, schlechter Prognose und einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert (Slamon, Clark et al. 1987; Pegram and Slamon 2000). Die Behandlung mit Herceptin hat sich hierbei als effektives Mittel bei der Behandlung von *HER2*-amplifizierten Mammakarzinomen erwiesen (Pegram, Lipton et al. 1998; Albanell and Baselga 1999).

Anhand des Beispiels *HER2* und der Bedeutung von *HER2* als therapeutischem Ziel wird deutlich, wie wichtig amplifizierte Gene für die Krebstherapie sein können.

So sind beim Mammakarzinom auch für viele andere Gene, wie z.B. für das Gen *MYC* auf 8q24 (Visscher, Wallis et al. 1997), *EGFR* auf 7p12 (Al-Kuraya, Schraml et al. 2004), *AIB* auf 20q13 (Anzick, Kononen et al. 1997) oder *CCND1* auf 11q13 (Simpson, Quan et al. 1997) Amplifikationen beschrieben worden. Dadurch, daß Genamplifikationen einen besonders wichtigen Mechanismus bei der Aktivierung von Onkogenen darstellen können, können diese Gene bzw. die entsprechenden Proteine die Bedeutung eines entsprechenden Therapieziels haben. Sie fungieren damit als ein besonderer Biomarker für das Ansprechen auf eine entsprechende Therapie (Beispiel: *HER2* bzw. *HER2*). Andererseits können Genamplifikationen von Onkogenen auch eine Resistenz gegen die entsprechenden Therapien vermitteln. In diesem Fall richtet sich die Therapie gegen die Funktion des betreffenden Onkogens, welches auch ohne Amplifikation cancerogen aktiv geworden ist. Durch die Amplifikation wird das entsprechende Protein (im Falle des AR bzw. des ER das Rezeptorprotein) so stark überexprimiert, daß es der Inhibierung seiner Funktion durch das Therapeutikum mit Hilfe der großen Anzahl an synthetisierten Proteinen und der entsprechend unvollständigen Blockade des Rezeptors durch die Moleküle des Therapeutikums entgehen kann („receptor overcrowding“). So wird durch die Amplifikation des Gens (*AR*) des Androgenrezeptors (*AR*) beim Prostatakarzinom eine Resistenz gegen die Antiandrogentherapie vermittelt. Während in unbehandelten Tumoren diese *AR*-Amplifikation offenbar nicht auftritt, entwickelt sich unter Einfluß der Antihormontherapie bei 20 - 30 % eine Amplifikation des Gens und vermittelt dann eine Resistenz gegenüber der Therapie (Visakorpi, Hyytinen et al. 1995; Koivisto, Visakorpi et al. 1996; Koivisto, Kononen et al. 1997; Koivisto, Kolmer et al. 1998; Bubendorf, Kolmer et al. 1999). Auch für Brusttumore, die das *HER2*-Protein besonders hoch exprimieren, wurde dieses Phänomen beschrieben (Bates, Sperinde et al. 2011).

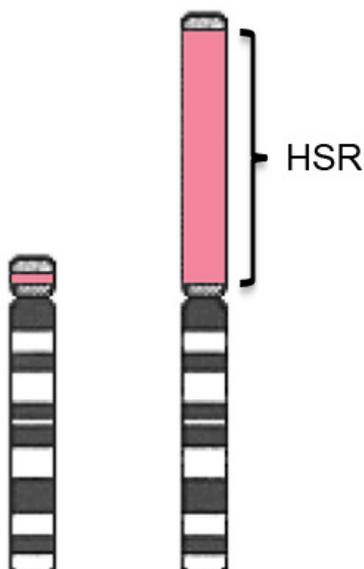
Möglicherweise sind Gene, die aufgrund ihrer Amplifizierung Krebszellen einen Wachstumsvorteil verleihen können, bisher noch unentdeckt bzw. nicht identifiziert. Häufig liegen größere Abschnitte der DNS vervielfältigt vor. Solche Amplikons beinhalten dann meist mehrere Gene, die relevant sein könnten. In solchen Fällen es ist schwierig, das Gen mit der entsprechenden Bedeutung herauszufinden.

Vor allem aber ist es schwierig Amplifikationen mit geringer Kopiezahl zu finden, da die molekularbiologischen Methoden der Wahl bis heute eine begrenzte Sensitivität besitzen.

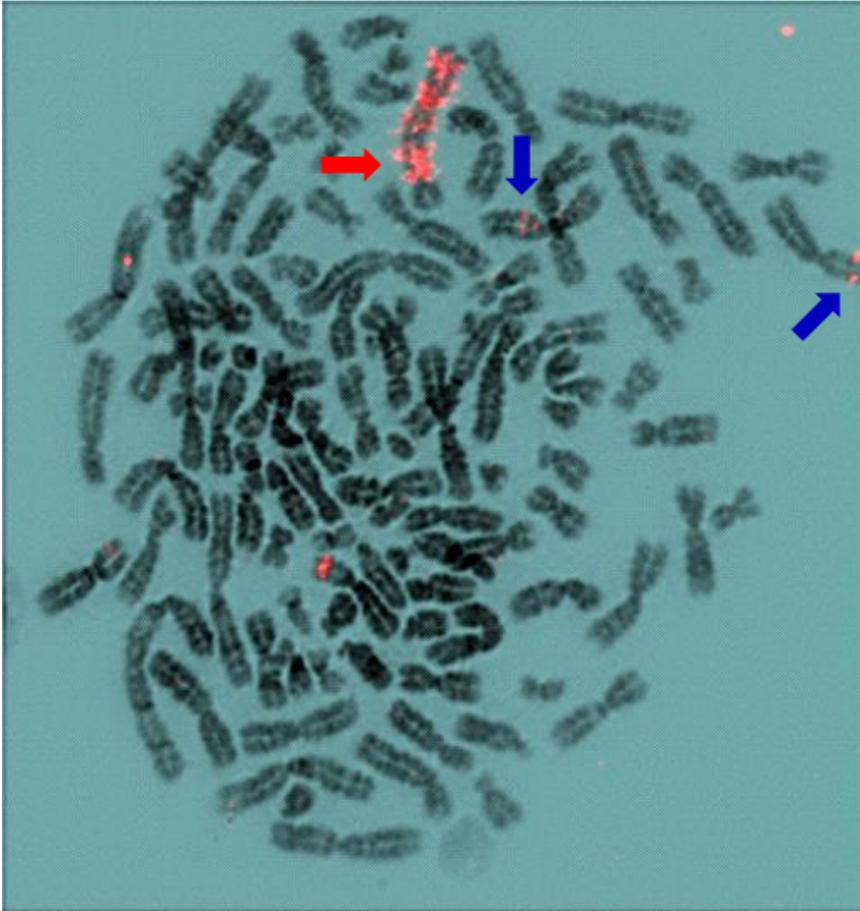
### 1.3.1 Amplifikationstypen

Genamplifikationen können intrachromosomal und extrachromosomal auftreten. Beim intrachromosomalen Typ liegen die amplifizierten DNS-Sequenzen in Reihe wiederholt nacheinander auf dem Chromosom und können dabei auch gegenläufige Orientierungen einnehmen. Wenn diese Sequenzen von entsprechender Länge und häufiger Kopiezahl vorliegen, ergibt sich auf dem Chromosom ein Bereich, welcher sich bei der klassischen Giemsa-Färbung oder der sequenzspezifischen Markierung mit fluoreszierenden DNS-Sonden von zytogenetischen Metaphase-Chromosomenpräparationen gleichmäßig anfärbt, da sich der Bereich aus Wiederholungen der gleichen Sequenz zusammensetzt. Einen solcher Bereich wird engl. als „homogeneous staining region“ (HSR) bezeichnet (**Abbildung 3**, **Abbildung 4** und **Abbildung 6**). Eine intrachromosomale Amplifikation bezeichnet man daher auch als HSR-Typ.

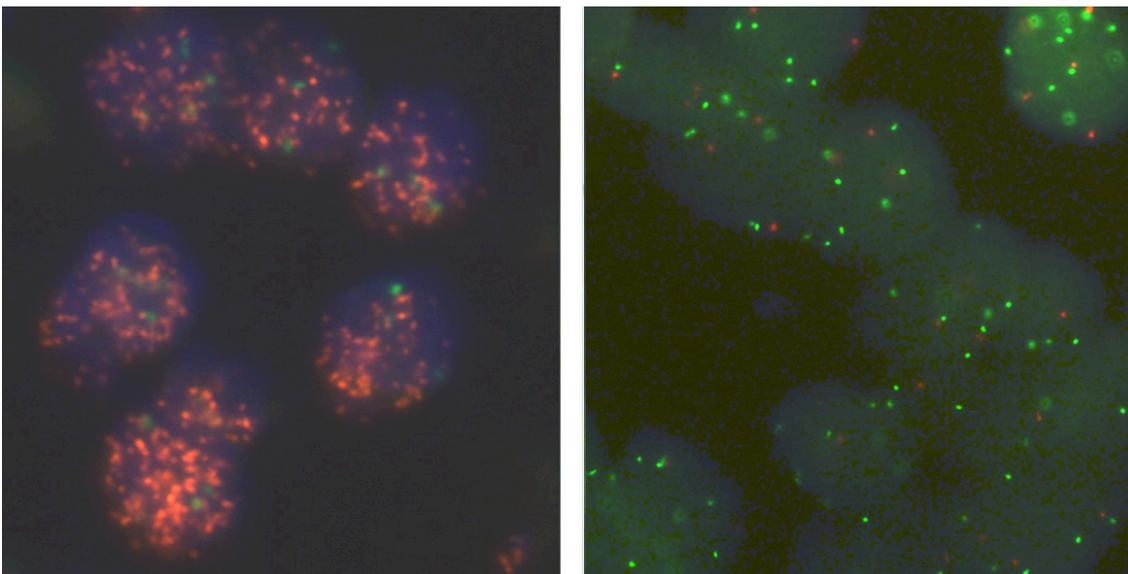
Beim extrachromosomalen Typ liegen die vervielfältigten DNS-Sequenzen außerhalb des Chromosoms in Form einzelner ringförmiger DNS-Moleküle vor. Abhängig von der Kopiezahl der vervielfältigten Sequenz liegen entsprechend viele, relativ kleine Chromatinringe im Zellkern vor (**Abbildung 5** und **Abbildung 9**).



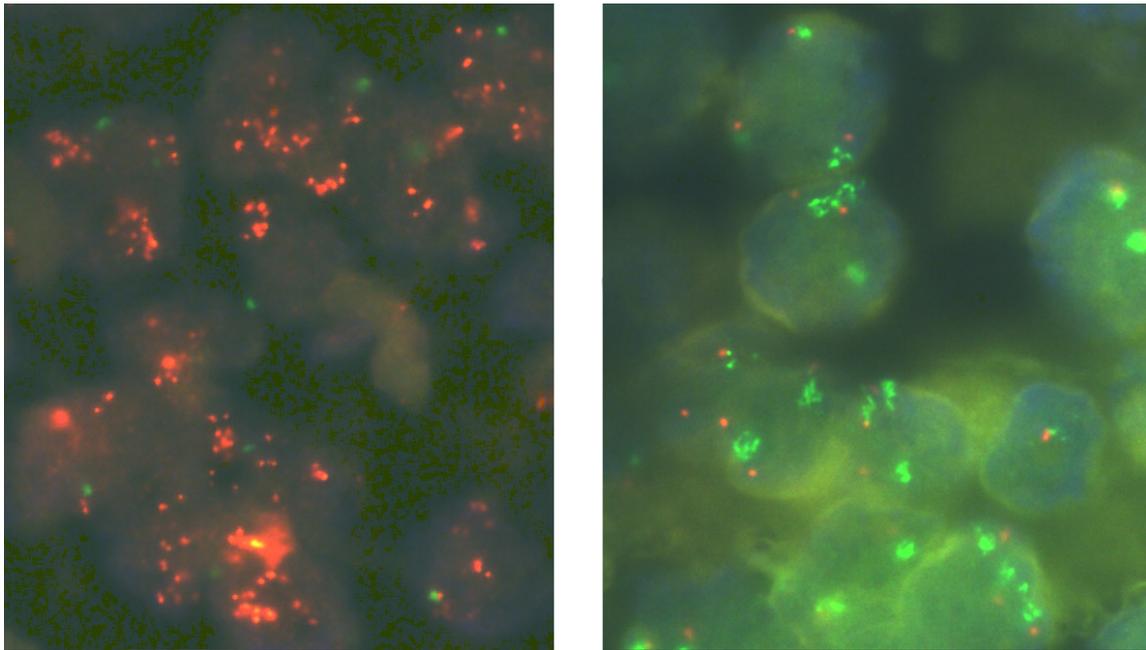
**Abbildung 3** Schematische Darstellung einer „HSR“ auf dem kurzen Arm eines Chromosoms. Links ist das Chromosom ohne die Amplifikation und rechts mit der amplifizierten Region des kurzen Arms (rot) dargestellt. Die amplifizierte Chromosomenregion ist rötlich eingefärbt. Abbildung nach (Brodeur 1992), modifiziert.



**Abbildung 4** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Metaphase einer Blasenkrebs-Zelllinie mit einer intrachromosomalen *E2F3*-Genamplifikation vom HSR-Typ auf dem p-Arm von Chromosom 6. Die *E2F3*-Kopien wurden mit der FISH-Methode rot fluoreszierend markiert. Gezeigt ist ein Chromosom mit entsprechender „HSR“ (roter Pfeil) und Chromosomen mit nicht amplifizierten Bereichen, bzw. normaler Genkopiezahl (blaue Pfeile). (Abbildung nach (MacLeod 2005))



**Abbildung 5** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100 $\times$ ) einer extrachromosomalen *EGFR*-Genamplifikation („high level“) (links) und einer extrachromosomalen *ESRI*-Amplifikation („low level“) (rechts) vom „double minute“-Typ in Interphase-Zellkernen (blau) eines Mammakarzinoms. Die *EGFR*-Kopien wurden mit der FISH-Methode orange-rot, die *ESRI*-Kopien grün fluoreszierend markiert. Das Zentromer 7 ist grün, das Zentromer 6 rot markiert. Eigene Aufnahmen.



**Abbildung 6** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) einer intrachromosomalen *HER2*-Genamplifikation („high level“) (links) und einer intrachromosomalen *ESR1*-Amplifikation („low level“) (rechts) vom HSR-Typ in Interphase-Zellkernen (blau) eines Mammakarzinoms. Die *HER2*-Kopien wurden mit der FISH-Methode orange-rot, die Zentromere 17 sind grün markiert (links). Die *ESR1*-Kopien sind grün fluoreszierend, die Zentromere 6 sind orange-rot markiert. Eigene Aufnahmen.

Aufgrund ihrer geringen Größe und ihres, vermutlich durch Replikationsvorgänge bedingten häufig gepaarten Auftretens, wird dieser Amplifikationstyp als „doppeltes Kleines“, engl. als „double minute“ (DM) bezeichnet. Die Anzahl der Kopien wird durch Zellteilungen immer weiter vermindert und die Amplifikation kann nicht aufrecht erhalten werden, wenn sich der Amplifikationsmechanismus nicht wiederholt oder die „DM“-DNS sich, ebenso wie die Chromosomen, auch bei der Zellteilung durch das Vorhandensein von Replikationsursprüngen replizieren. Offenbar werden DMs durchaus in der S-Phase des Zellzyklus repliziert, jedoch aufgrund fehlender Zentromere nicht gleichmäßig, sondern zufällig auf die Tochterzellen verteilt (Kuttler and Mai 2007).

In der FISH-Analyse von Zellkernen in der Interphase erscheinen extrachromosomale Amplifikationen nicht als Signal-Cluster, sondern als zufällig im Zellkern verteilte FISH-Signale.

### 1.3.2 Genamplifikationsmechanismen

Für die molekulargenetischen Mechanismen, durch die Genamplifikationen entstehen, sind unterschiedliche Modelle entwickelt und vorgeschlagen worden. Einige davon haben sich aufgrund ihrer Plausibilität und experimentell erbrachte empirische Nachweise weitgehend etabliert. Es ist daher davon auszugehen, daß Genamplifikationen durch verschiedene unabhängige Mechanismen entstehen können, von denen drei molekulargenetische Vorgänge die gängigsten Modelle darstellen, deren wesentlichste Charakteristika im Folgenden umrissen werden.

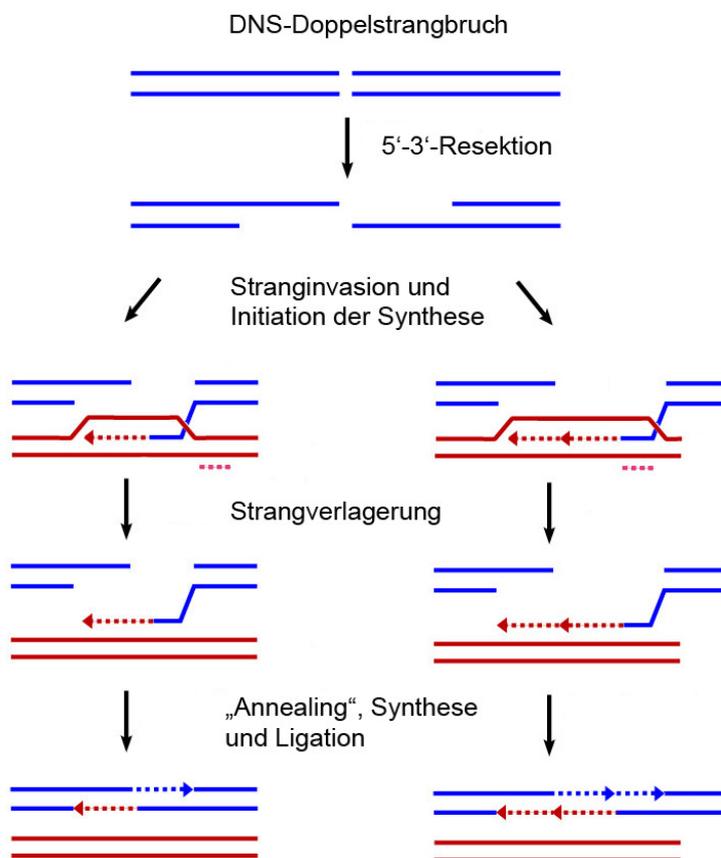
Wie erwähnt (Kapitel 1.2.1), gelten Genamplifikationen als Ausdruck pathogener molekulargenetischer Veränderungen bzw. entsprechender pathologischer Vorgänge.

So sind Tumorzellen meist genetisch instabil (Gisselsson, Pettersson et al. 2000; Anderson 2001; Charames and Bapat 2003). Dies wird auf geschädigte Reparaturmechanismen zurückgeführt (Lengauer, Kinzler et al. 1998; Gisselsson, Pettersson et al. 2000; Beckman and Loeb 2005; Thompson, Bakhoun et al. 2010). So können in Tumoren beispielsweise auch Reparaturmechanismen beeinträchtigt sein, die an der Reparatur von Chromosomenbrüchen beteiligt sind, so daß in der Zelle weniger exakte Mechanismen wirksam werden (Hastings, Ira et al. 2009; Hastings, Lupski et al. 2009). Zudem wird vorausgesetzt, daß die Funktion von Genen außer Kraft gesetzt ist, die eine prüfende Funktion im Zellzyklus ausüben und die Zellteilung stoppen oder einen Zelltod (Apoptose) auslösen würden, wenn genetische Instabilität und entsprechende Abberationen auftreten (Gisselsson, Pettersson et al. 2000; Thompson, Bakhoun et al. 2010).

#### 1.3.2.1 Homologe Rekombination

So liegt es nahe, daß in Tumorzellen, in denen auch durch eine gestörte Kontrolle der Zellteilung häufig ein aneuploider Chromosomensatz vorliegt, nicht nur gehäuft Chromosomenbrüche, sogenannte Doppelstrangbrüche (DSB) auftreten, sondern diese auch unzureichend repariert werden. DNS-Doppelstrangbrüche werden im Zellkern durch Mechanismen der homologen oder der sogenannten nicht homologen Rekombination repariert (Helleday 2003; Hastings, Ira et al. 2009; Hastings, Lupski et al. 2009; Moynahan and Jasin 2010). Hierbei werden DNS-Doppelstrangbrüche bzw. entsprechende Chromatinverluste durch die Anlagerung des defekten DNS-Stranges an die homologen Sequenzen des intakten Schwesterchromatids oder anderer homologer Sequenzen repariert. Bei der Reparatur der defekten Sequenz dient die intakte Sequenz als Matrize. Weicht ein defizitär arbeitender

Mechanismus bei der Anlagerung des defekten Stranges am Schwesterchromatid auf eine versetzt liegende homologe Zielsequenz aus, die in ihrer homologen Sequenz von der Originalsequenz auch leicht abweichen kann, kann dies zu einer Deletion oder Duplikation der Sequenz führen, welche zwischen den homologen Bereichen liegt. Durch ein wiederholtes Auftreten dieses Vorgangs, kann es entsprechend auch zu einer stärkeren Vermehrung der Kopiezahl (Amplifikation), sowie zu einer Übertragung einmal vermehrter DNS-Sequenzen auf homologe Chromosomen kommen. Da dieser Mechanismus durch homologe Sequenzen vermittelt wird, treten hier auch sogenannte „Hot Spots“, gehäuft vorkommende Stellen, für die Anfangs- bzw. Endbereiche von amplifizierten DNS-Sequenzen auf (Hastings, Lupski et al. 2009; McVean 2010).

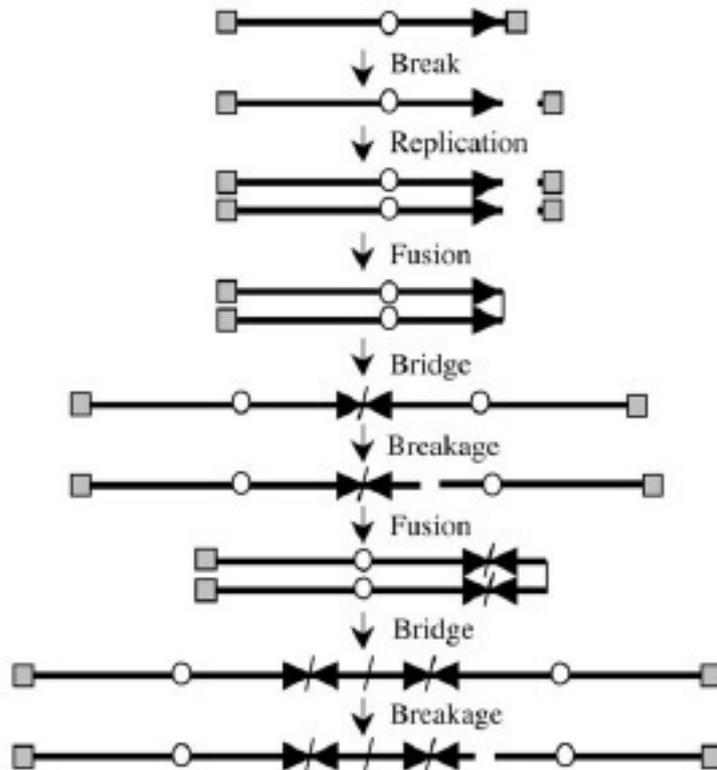


**Abbildung 7** Schematische Darstellung somatischer Rekombination.

Nach diesem Modell wird ein DNS-Doppelstrangbruch (blau) repariert, indem der homologe DNS-Doppelstrang (rot) als Matrize der Reparatursynthese dient (links). Lagert sich der gebrochene Strang an einer versetzt liegende Homologie an (violett gepunktet gekennzeichnet), wird der Zwischenbereich verdoppelt (rechts). Abbildung nach (Barlow and Rothstein 2010), modifiziert.

### 1.3.2.2 Das Breakage-Fusion-Bridge-Modell

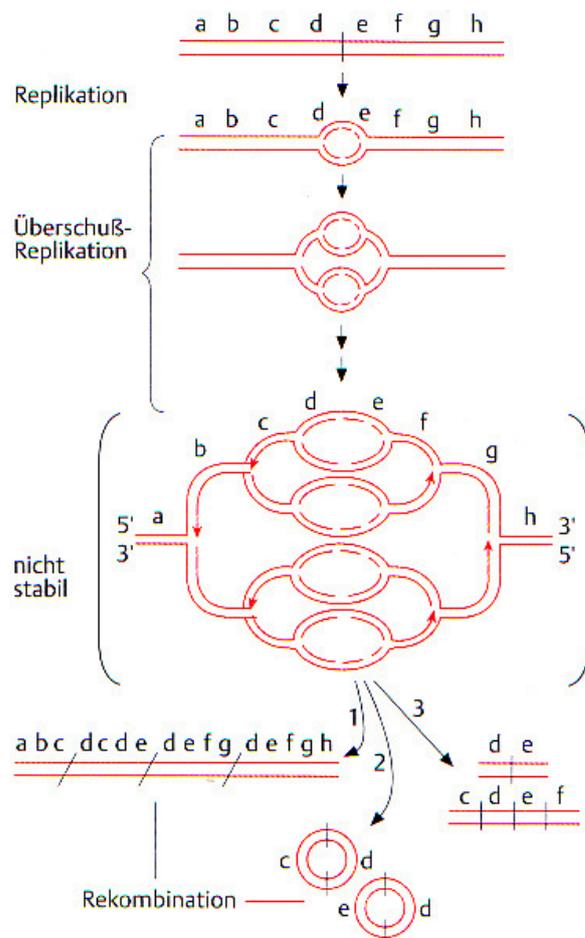
Das Auftreten von Genamplifikationen höherer Kopiezahl wird auch durch den sogenannten „Breakage-Fusion-Bridge“-Mechanismus (BFB) verursacht. Dem Namen entsprechend beruht auch dieser Mechanismus auf Chromosomenbrüchen, also DNS-Doppelstrangbrüchen. Kommt es nach solchen Brüchen zur mitotischen Replikation des betreffenden Chromosoms, entstehen zwei Schwesterchromatide mit je einem offenen DNS-Doppelstrangende ohne Telomer. Solche offenen Enden benachbarter Schwesterchromatide können in sogenannten Anaphase-Brücken miteinander verbunden werden (Gisselsson, Jonson et al. 2001). So entsteht ein dizentrisches Chromosom mit zwei Zentromeren, welches in der Anaphase, bei der Verteilung auf zwei verschiedene Tochterzellen, wieder zerrissen wird, wodurch eine neue Bruchstelle entsteht. Je nach Lage der jeweiligen Bruchstellen entstehen so Chromosomzugewinne bzw. Verluste bei den Schwesterchromatiden. Bei einer entsprechenden Abfolge der Brüche können sich so bestimmte Chromosomenabschnitte akkumulieren und somit eine Genamplifikation bilden (Lo, Sabatier et al. 2002) (**Abbildung 8**). Verleihen auf diesen Abschnitten gelegene Gene einen Proliferationsvorteil, selektieren sich Zellen mit höherer Kopiezahl des jeweiligen Gens heraus und halten einen großen Anteil von Tumorzellen aufrecht, die eine relativ hohe amplifizierte Genkopiezahl tragen. Die für diesen Mechanismus notwendigen Chromosomenbrüche entstehen nicht nur zufällig, sondern können auch hier an ganz bestimmten Stellen im Genom gehäuft auftreten. Verantwortlich sind inverse Sequenzwiederholungen, sogenannte „inverted repeats“, an denen sich die DNS-Einzelstränge des doppelsträngigen Chromosomenbereichs zu sogenannten Haarnadelschleifen (engl.: „hairpin loop“) zusammenlegen können. Hierdurch vermittelte enzymatische Reaktionen trennen den Chromosomendoppelstrang und verbinden die offenen Einzelstränge wieder in einer neuen Haarnadelschleife. Durch die am offenen Chromosomenende miteinander verbundenen Enden der Einzelstränge des chromosomalen DNS-Doppelstrangs kann bei der Replikation die DNS-Polymerase von einem auf den anderen Strang durchlaufen und so ein dizentrisches Chromosom herstellen, welches während der Anaphase erneut bricht. (Narayanan, Mieczkowski et al. 2006; Narayanan and Lobachev 2007).



**Abbildung 8** Schematische Darstellung des „Breakage-Fusion-Bridge“-Mechanismus. Zentromere sind durch runde weiße, Telomere durch eckige graue und das amplifizierte Gen durch schwarze dreieckige (bzw. Pfeile) Symbole dargestellt. Erläuterungen siehe Text. Abbildung aus (Lo, Sabatier et al. 2002).

### 1.3.2.3 Der Replikationsgabelmechanismus: das „Onion-Skin“-Modell

Ein weiterer gut untersuchter Amplifikationsmechanismus ist der Replikationsgabelmechanismus. Dieser ist beispielsweise durch Untersuchung an den Zellen der Eihülle der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sehr gut dokumentiert (Osheim, Miller et al. 1988; Claycomb, Benasutti et al. 2004; Tower 2004; Claycomb and Orr-Weaver 2005; Calvi, Byrnes et al. 2007). Entstehen Replikationsgabeln auf einen bestimmten Chromosomenbereich lokal beschränkt, wird die entsprechende DNS-Sequenz des Bereichs dupliziert. Entstehen innerhalb dieser Replikationsgabel weitere Replikationsgabeln, wird der entsprechende Bereich weiter über ein normales Maß hinaus repliziert. Es entstehen zusätzliche Genkopien, das Gen wird amplifiziert (**Abbildung 9**). Aufgrund seiner einem Zwiebelhautmuster ähnlichen schematischen Struktur wird das Modell auch „Onion-Skin“-Modell genannt (Tower 2004). Die amplifizierten Sequenzen der „Onion-Skin“-Struktur können durch verschiedene molekulargenetische Rekombinationsprozesse zu linear angeordneten intrachromosomalen Amplifikationen vom HSR-Typ umgebildet oder auch als extrachromosomale „double-minutes“ ausgeschleust werden (**Abbildung 9**). Der Replikationsgabelmechanismus ist allerdings beim Menschen bisher nicht beschrieben (Stark and Wahl 1984; Stark, Debatisse et al. 1989; Syu and Fluck 1997; Tower 2004; Vogt, Lefevre et al. 2004).



**Abbildung 9** Schematische Darstellung des Replikationsgabelmechanismus. Die lokal replizierten DNS-Abschnitte können durch Rekombinationsvorgänge sowohl zu linear angeordneten Amplifikationen vom HSR-Typ (1) oder zu extrachromosomalen Amplifikationen vom DM-Typ (2) umgebildet, als auch als einzelne lineare DNS-Stränge freigesetzt werden (3). Die jeweiligen genomischen DNS-Abschnitte sind mit kleinen Buchstaben bezeichnet. Abbildung aus (Knippers 2001), nach (Stark, Debatisse et al. 1989).

## 1.4 Evaluierung und Spezifizierung von Methoden zur Detektion von Genamplifikationen

Die heute üblichen Techniken zur Identifikation und Detektion von Genkopiezahlveränderungen sind die Oligonukleotid-Array-Technologie (Genchips), welche eine Weiterentwicklung der „Comparative genomic hybridization“ (CGH, bzw. aCGH (arrayCGH)) ist, die „quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

Eine früher angewandte und heute eher ungebräuchliche Methode zur Detektion von Genamplifikationen, mit der einige der ersten Entdeckungen dieser Art gemacht wurden, stellt die sogenannte „Southern Blot“-Methode dar (Collins and Groudine 1982; Alitalo, Schwab et al. 1983; Schwab, Alitalo et al. 1983; Schwab 1994).

### 1.4.1 Southern Blot

Beim „Southern Blot“ handelt es sich um eine 1975 von Edwin Southern entwickelte molekularbiologische Untersuchungsmethode für DNS, die den Nachweis einer bestimmten Gensequenz in einem DNS-Gemisch (z.B. dem genomischer DNS) mit Hilfe einer spezifischen Sonde ermöglicht (Southern 1975).

Dabei ist auch eine relative bzw. mit Hilfe eines Standards eine absolute Mengenabschätzung möglich.

Die zu untersuchende DNS wird mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen behandelt und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die DNS-Fragmente werden durch Alkalien in Einzelstränge gespalten und das im Agarosegel entstandene Trennmuster auf eine Membran (meist Nylon oder Nitrocellulose) übertragen („Blotting“) und dort meist durch UV-Bestrahlung („UV-Crosslinking“) dauerhaft fixiert.

Anschließend wird auf die Membran eine chemisch oder radioaktiv markierte Gensonde aufgebracht, welche zur gesuchten Sequenz komplementär ist.

Alle unspezifischen Bindungen werden anschließend abgewaschen. Je nach Markierung der Sonde erfolgt die Detektion z.B. durch Auflegen der Membran auf einen Röntgenfilm, Fotopapier oder sogenannte „Phosphorimager“-Platten. Ist die Sonde an ein Enzym gekoppelt, so kann die enzymatische Reaktion auf der Membran detektiert werden.

Je mehr DNS mit der Zielsequenz der Sonde in dem aufgetrennten und schließlich auf der Membran fixierten DNS-Gemisch vorhanden ist, desto mehr Sonde bindet an den entsprechenden Bereich auf der Membran. Entsprechend stärker fällt die Färbung bei der

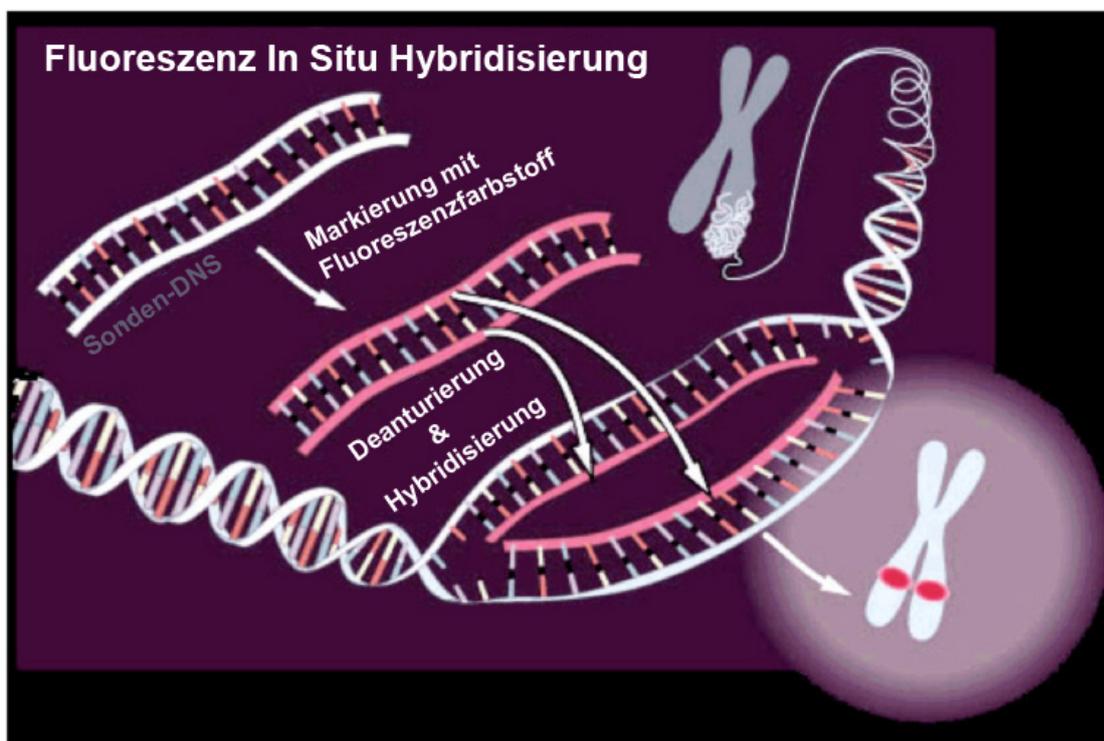
Detektion der Sonde aus. Durch die Stärke der Färbung ist dann eine Abschätzung der Menge an Zielsequenz möglich.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Auflösung, des großen Bedarfs an DNS-Material und der ungenauen quantitativen Abschätzbarkeit wurde die „Southern Blot“-Methode zur Detektion von Genamplifikationen allerdings weitgehend durch andere Methoden verdrängt.

### 1.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

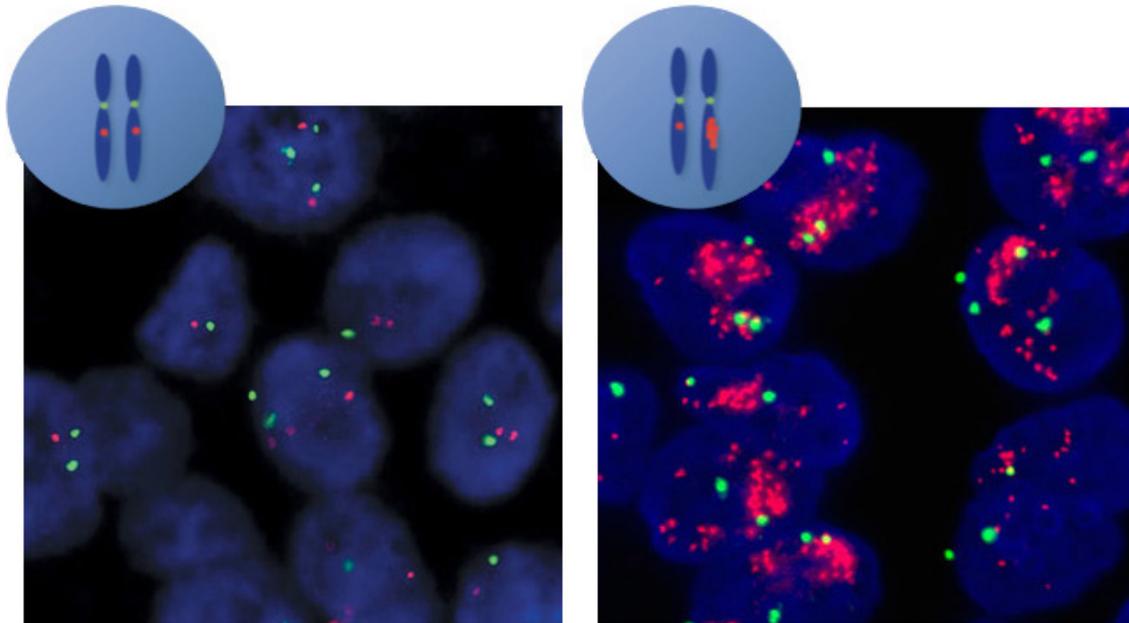
Mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist es dagegen möglich, in einem Gewebeschnitt einen einzelnen Zellkern zu betrachten und somit die Genkopiezahl einzelner Zellen zu analysieren. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte DNS-Abschnitte als Gensonden auf die komplementäre Ziel-DNS auf dem Chromosom hybridisiert. Dadurch wird diese spezifische Sequenz fluoreszenzlichtmikroskopisch sichtbar farblich markiert. So kann die Anzahl der enthaltenen Sequenzen direkt visuell ermittelt werden.

Die FISH-Technik bietet zusammen mit der „Tissue microarray“-Technik die Möglichkeit mit verhältnismäßig geringem Materialaufwand und relativ kostengünstig viele verschiedene Gewebeproben in einem Arbeitsgang zu untersuchen. Diese Technik eignet sich allerdings nur zur Detektion bekannter Genloci. Daher ist sie für die Suche nach unbekanntem Genkopiezahlveränderungen zwar unbrauchbar, aber geeignet, potentiell interessierende Sequenzen auf ihre Kopiezahl hin in größeren Gewebekollektiven zu untersuchen.



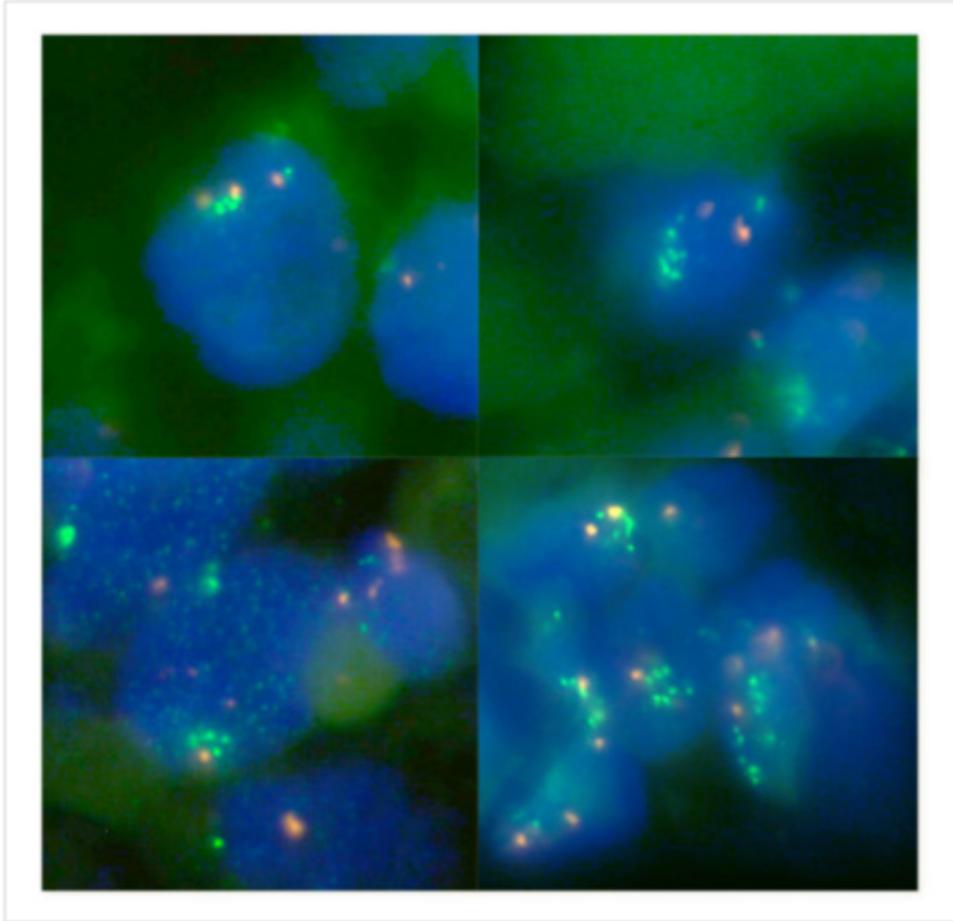
**Abbildung 10** Schematische Darstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Sequenzspezifisch ausgewählte DNS-Abschnitte (Sonden-DNS) werden fluoreszenzmarkiert und als Gensonden auf die durch Hitze denaturierte komplementäre Ziel-DNS auf dem Chromosom hybridisiert. Auf dem entsprechenden Chromosomen (hier ein weiß dargestelltes Metaphasechromosom) erscheinen dann die Gensequenzen mit punktförmigen Leuchtsignalen markiert. Abbildung der West Coast Pathology Laboratories.



**Abbildung 11** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) von Interphasezellkernen (blau) mit normaler Genkopiezahl (links) des Gens *HER2* (rot), mit *HER2*-Genamplifikation (rechts) und dem Zentromer des Chromosoms 17 als Referenz.

Abbildungen aus (Han, Kim et al. 2009) (links) und der „Actualisation Continue des Connaissances des Enseignants en Sciences “ (ACCES) (rechts). Die Fotografien wurden durch schematische Darstellungen der Chromosomen entsprechend des jeweiligen Amplifikationsstatus ergänzt.



**Abbildung 12** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100×) von Interphasezellkernen vier verschiedener Mammatumore mit *ESRI*-Kopiezahlgewinn.

Es sind ca. 4 - 6 *ESRI* Kopien (Zellkerne linke Seite) pro Zellkern (blau) bzw. ca. 6 - 10 *ESRI* Kopien (Zellkerne rechte Seite) zu sehen. Vier verschiedene fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellkernen (blau) eines Mammakarzinoms (blau) als repräsentative Beispiele von unterschiedlichen typischen *ESRI*-Amplifikationen. Die *ESRI*-Sequenzen sind durch grüne FISH-Signale, die Zentromere des Chromosoms 6 orange-rot markiert. Es sind ca. 4 - 6 *ESRI* Kopien (Zellkerne linke Seite) pro Zellkern (blau) bzw. ca. 6 - 10 *ESRI* Kopien (Zellkerne rechte Seite) zu sehen. Eigene Aufnahmen.

### 1.4.3 Komparative genomische Hybridisierung (CGH), aCGH und Genchips

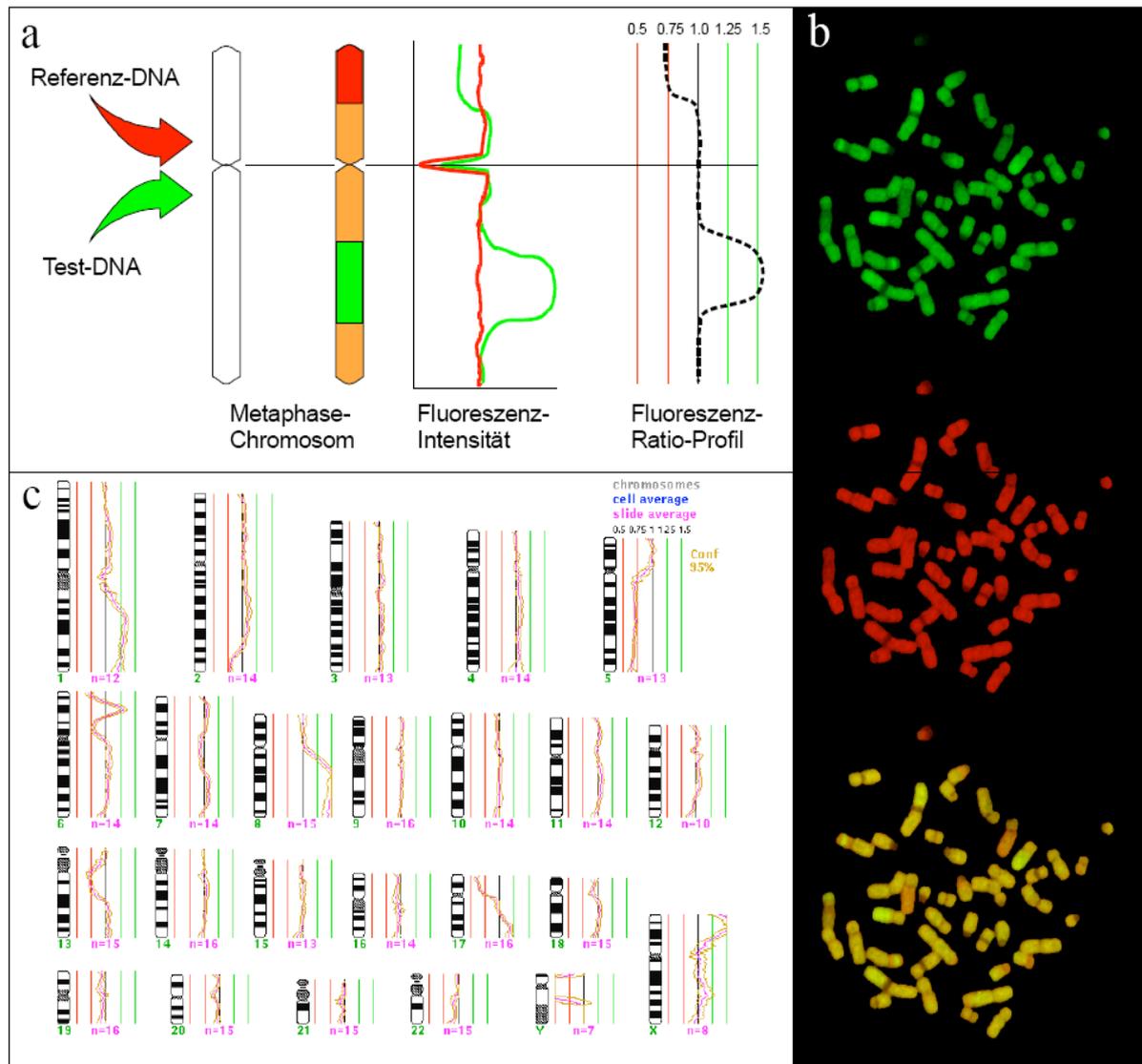
Die erste Technik, mit der in einem einzigen Untersuchungsansatz Veränderungen der Genkopiezahl im gesamten Genom eines Individuums gleichzeitig analysiert werden konnte, ist die „Comparative genomic hybridization“ (CGH), die 1992 von Kallioniemi et al. vorgestellt wurde (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992). Hierzu wird die zu untersuchende DNS mit einer normalen Referenz-DNS verglichen. Diese Referenz-DNS dient als Kontrolle für lokale Variationen bzgl. der Hybridisierungsqualität der Test-DNS auf den Ziel-Chromosomen.

Hierbei werden die zu vergleichenden und fluoreszenzfarblich unterschiedlich markierten Chromosomensätze in Form von DNS-Lösungen auf einem Metaphase-Chromosomensatz hybridisiert, welcher auf einer festen Matrix fixiert ist. So ergibt sich als resultierende Färbung des hybridisierten Chromosomensatzes durch die Mischfärbung der beiden DNS eine relative Ratio der beiden verschiedenfarbigen Fluoreszenzen. Je nach Häufigkeit (Kopiezahl) der Chromosomenabschnitte bzw. DNS-Sequenzen in der zu untersuchenden Proben-DNS überwiegt (im Falle einer vorliegenden Kopiezahlvermehrung) auf den hybridisierten Arealen die Färbung der zu untersuchenden DNS-Probe bzw. die der normalen Referenz-DNS (im Falle einer vorliegenden Deletion) im entsprechenden Areal. Die beiden Färbungen halten sich die Waage, wenn keine Genkopiezahlveränderung vorliegt. In **Abbildung 13** ist eine CGH dargestellt.

Da mit dieser konventionellen CGH alle Chromosomen in einem einzigen Experiment analysiert werden können, war sie lange Zeit eine viel eingesetzte Technik zum schnellen Rastern des Genoms.

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

Dieser Limitierung konnte man mit der Weiterentwicklung der CGH zur „microarray based CGH“ („Array-CGH“) begegnen. Diese „Array-CGH“ (aCGH) beruht auf dem gleichen Prinzip wie die konventionelle CGH. Die Metaphase-Chromosomen sind hier jedoch durch geklonte DNS-Fragmente (ca. 100 - 200 Kb) ersetzt.



**Abbildung 13 a)** Schematischer Ablauf einer CGH-Analyse.

Ein Ratio-Profil der Fluoreszenzsignale von 1,0 entspricht normalen DNS-Kopiezahlverhältnissen in der Proben-DNS. Veränderungen der Ratio über 1,25 werden als Zugewinne, Verschiebungen unter 0,75 als Verluste chromosomalen Materials der Probe am entsprechenden chromosomalen Lokus gewertet. **b)** Fluoreszenzmikroskopische Fotografien von Metaphasechromosomen, die mit grüner (FITC-markierter) TumordNS (oben) und roter (Rhodamin-markierter) Referenz-DNS (Mitte) markiert wurden. Die synchrone Anregung der grünen und roten Fluoreszenz (unten) zeigt Zugewinne der Proben-DNS als Bereiche mit entsprechend überwiegender grüner Fluoreszenz, während bei DNS-Verlusten entsprechend die rote Fluoreszenz überwiegt. **c)** CGH-Ratio-Profil: Die roten Linien repräsentieren die Niveaus mono- bzw. bialelelischer Deletionen, die grünen Linien ein- bzw. zweifache Zugewinne. Die violetten Kurven repräsentieren den Mittelwert der Signal-Ratio der Probe, die beiderseitigen gelben Kurven stellen die Standardabweichung in dem korrespondierenden chromosomalen Bereich dar (siehe auch Text). Abbildung aus (Simon 1999).

Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer viel differenzierteren Auflösung bei der Detektion von Abberationen und die Veränderungen lassen sich direkt der entsprechenden Sequenz des DNS-Fragments zuordnen, anstatt lediglich Aussagen über relativ grob aufgelöste Chromosomenregionen machen zu können.

Den zur Zeit letzten Stand in der Weiterentwicklung dieser Art der Technik stellen Oligonukleotid-Arrays (Genchips) dar, die ein noch höheres Auflösungsvermögen besitzen (bis zu ca. 15 kb) (Borozdin, Graham et al. 2007). Hierbei werden repräsentativ für die Chromosomenregionen ca. 20 bp große DNS-Sequenzen (Oligonukleotide) verwendet. Durch die reduzierte repräsentierte DNS-Menge läßt sich eine viel größere Zahl an repräsentativen Genom-Abschnitten abbilden.

So können mit der Genchip-Technologie inzwischen zehntausende bis Millionen Orte pro Untersuchung auf den DNS-Strängen des gesamten Chromosomensatzes untersucht werden. Daher können alle bekannten Gene des Menschen aus der DNS einer Gewebeprobe an mehreren Stellen mit einer Untersuchung analysiert werden, während bei der qPCR und der FISH in der Regel pro Untersuchungsvorgang nur ein definierter, dafür aber kurzfristig frei wählbarer DNS-Lokus untersucht werden kann.

Bei dieser Technologie wird im Gegensatz zur CGH nicht mehr mit normaler Referenz-DNS gearbeitet. Dafür sind die repräsentativen Oligonukleotidsequenzen im Vergleich zur Proben-DNS im „Überschuß“ auf der Trägermatrix fixiert. Je mehr von einer repräsentierenden Sequenz auch in dem DNS-Sequenzgemisch der Proben vorhanden ist, in desto stärkerem Maße können die entsprechenden Sequenzen auf der Trägermatrix abgesättigt hybridisiert werden. Die Kopiezahl wird daher nur durch die Intensität und die fluoreszenzspektrometrische Messung einer fluoreszenzmarkierten Sequenz ermittelt.

Bei der Genchip-Technik werden für bestimmte repräsentative DNS-Abschnitte passende Oligonukleotide in vielfacher Anzahl auf einer Trägermatrix gebunden. Je mehr Anteile einer Sequenz nun in der Proben-DNS vorhanden sind, desto öfter hybridisieren solche Sequenzen an die entsprechenden Oligonukleotidsequenzen auf der Trägermatrix des Chips. Da die gesamte Proben-DNS fluoreszenzmarkiert ist, lassen sich die Hybridisierungsverhältnisse entsprechend vergleichend fluoreszenzspektrometrisch maschinell auslesen.

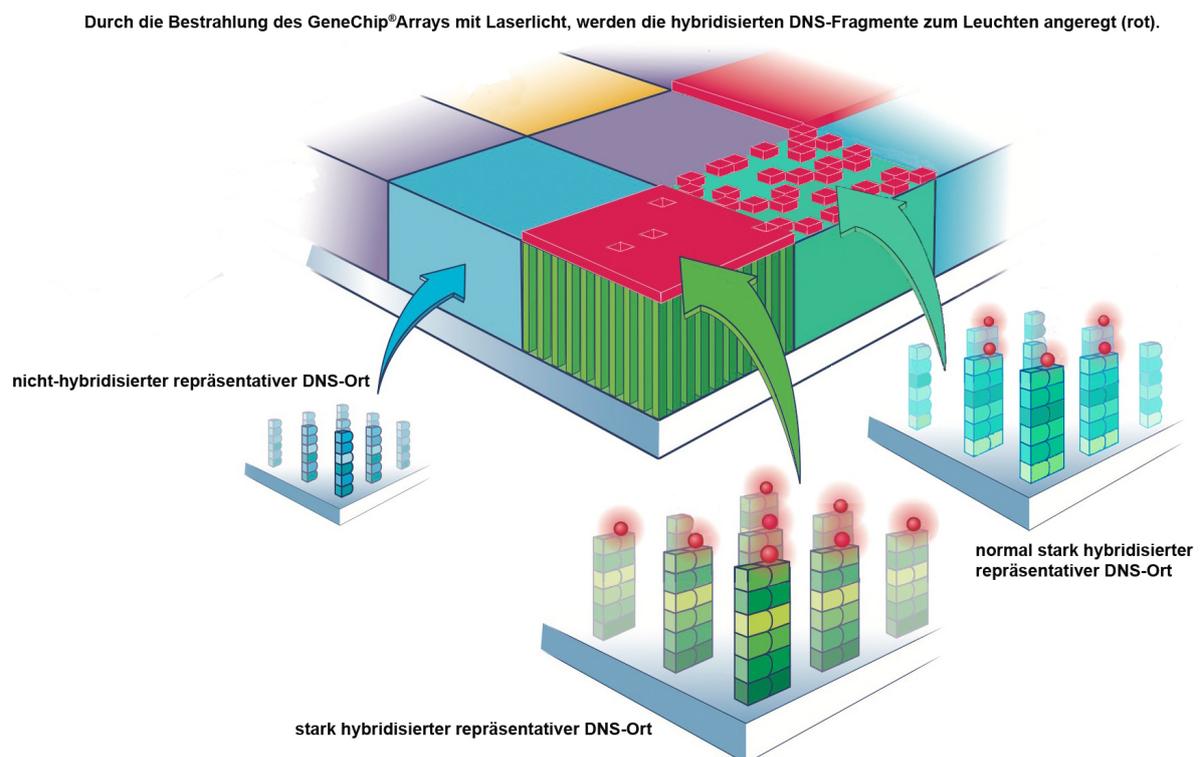
Die so entstehenden Daten werden dann bioinformatisch verarbeitet und können graphisch dargestellt werden.

Die Genchip-Technik zeichnet sich daher, im Vergleich zu ihren Vorgängermethoden, durch eine vergleichsweise große Auflösung und Sensitivität aus.

Durch die Auswahl repräsentativer Sequenzen ergibt sich zwar, daß mit einer Untersuchung nur zuvor definierte DNS-Loci untersucht werden können, diesem Umstand kann allerdings durch die inzwischen sehr hohe Dichte dieser zuvor festgelegten Loci sehr gut entgegengewirkt werden.

Auch besteht bei der Genchip-Technologie eine gewisse Hybridisierungsungenauigkeit, Artefaktanfälligkeit und die Schwierigkeit der algorithmischen Berechnung der großen Anzahl der elektronisch ausgelesenen Daten, welche ein nicht unerhebliches bzw. vernachlässigbares „Hintergrundrauschen“ aufweisen. Auch wirkt die hohe Kostenintensität einer großen Anzahl von Untersuchungsproben entgegen.

Jedoch hat die höher auflösende Genchip-Technologie mit ihrer steigenden Leistungsfähigkeit und sinkenden Kostenintensität die CGH bzw. aCGH weitgehend verdrängt. So spielte für dieses Projekt, dessen Teil diese Arbeit ist, nur noch die Genchip-Technologie eine Rolle.

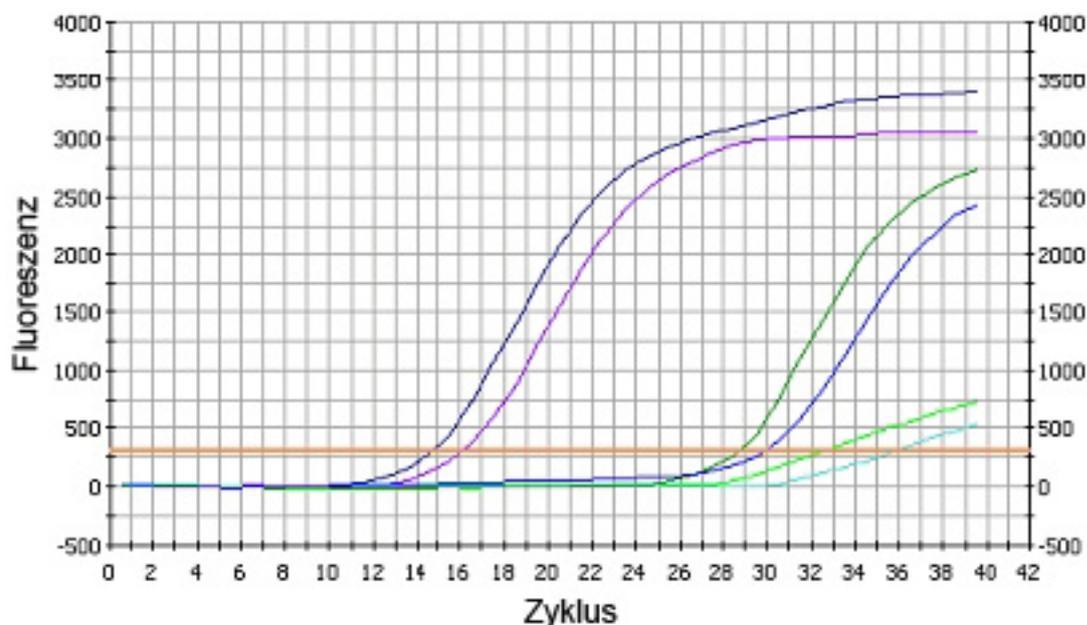


**Abbildung 14** Schematischer Aufbau eines Genchips und die Schematische Darstellung der Signalentstehung auf einem Genchip durch die Hybridisierung mit rot fluoreszierend markierter Proben-DNS: Die Hybridisierungshäufigkeit der Proben-DNS erfolgt nicht entweder vollständig oder gar nicht, sondern es sind Abstufungen in der Intensität der Hybridisierung und somit der Signalverteilung auf die einzelnen Oligonukleotid-Kompartimente möglich, so daß Abstufungen der Kopiezahlveränderungen bzgl. der repräsentativen Oligonukleotidsequenz abschätzbar werden (siehe auch Text). Abbildung der Firma Affymetrix, modifiziert.

### 1.4.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ist eine gängige Methode, um bekannte bzw. identifizierte Loci einzeln und gezielt präziser zu untersuchen und ggf. bestehende Ergebnisse zu verifizieren. Hier kann eine bestimmte, kurzfristig wählbare Sequenz auf ihre in der Probe befindliche Kopiezahl bzgl. einer ebenfalls in der DNS-Probe enthaltene Referenzsequenz hin untersucht werden. Hierbei stößt man nicht auf die Art der Artefaktanfälligkeit und Schwierigkeit der algorithmischen Berechnung, wie sie bei der Genchip-Technologie auftritt. Auch benötigt man nur verhältnismäßig geringe Mengen an DNS.

Dabei werden die interessierenden Sequenzen spezifisch in zyklischen Abläufen in jeweils Zweierpotenzen vermehrt (siehe auch **Abbildung 15**). Die Vermehrung läßt sich über verschiedene Varianten der Fluoreszenzmarkierung und -photometrie von Zyklus zu Zyklus verfolgen. Ab einer bestimmten Zyklenzahl hat die DNS-Menge ein Maß erreicht, das eine fluoreszenzphotometrische Messung und Bestimmung der DNS-Menge zuläßt, die sich vom Hintergrundrauschen unterscheidet. Je größer die DNS-Menge, desto kleiner ist die Zyklenzahl bei der sich der Meßwert signifikant vom Hintergrund unterscheiden läßt. Die Auflösung der Methode ergibt sich aus der Verdopplung der DNS-Menge pro Zyklus (Lynch and Brown 1990; Pfaffl 2004; Holzapfel 2007; Bustin, Benes et al. 2009).



**Abbildung 15** Kurvendiagramm einer qRT-PCR.

Die Signalintensität, welche der sequenzspezifischen DNS-Kopiezahl proportional ist, ist über die Zyklenzahl aufgetragen. Die orange Linie stellt die sogenannte „Baseline“ dar, welche auf der Y-Achse ein signifikantes Überschreiten des Intensitätsniveaus des Grundrauschens der Gesamtfluoreszenz darstellt. Jede der farbig dargestellten Linien repräsentiert eine DNS-Probe (Abbildung des Forschungszentrums Jülich).

---

Sowohl bei der Genchip-Technologie als auch der qPCR wird immer das Mittel der DNS-Mengenverhältnisse einer gesamten Probe untersucht. Jegliche Heterogenität bzw. Unterschiede zwischen einzelnen Zellen bleiben hierbei unberücksichtigt. Es besteht zwar die Möglichkeit der Mikrodissektion einer Tumorprobe, bei der bestimmte einzelne interessierende Bereiche gezielt herausgenommen werden können, jedoch handelt es sich hierbei immer noch um ganze Gewebefragmente, die viele hundert bis tausend Zellen umfassen müssen, um eine ausreichend große Menge an DNS für die Analyse zu erhalten. Dadurch, daß bei diesen Techniken immer die Gesamt-DNS aus diesen Zellen untersucht wird, ergibt sich im Ergebnis, beispielsweise beim Kopiezahlverhältnis, immer ein Durchschnittswert.

## 1.5 Vorarbeiten

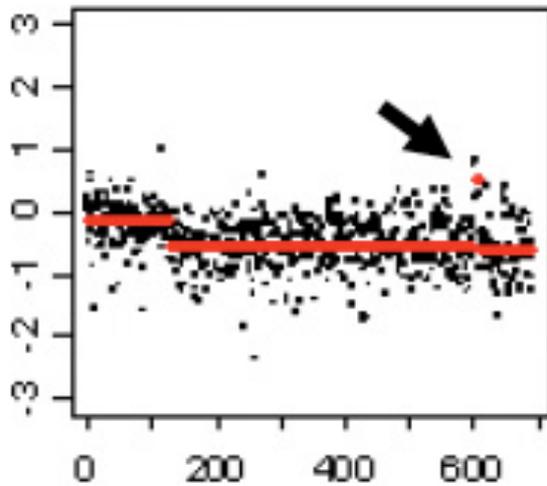
Die vorliegende Arbeit basierte auf Daten aus Genchip-Analysen, für die zu Beginn dieses Projekts zunächst entsprechende Arbeiten durchgeführt wurden. Diese wurden von Dr. phil. Christian Ruiz entsprechend seiner Dissertation (Ruiz 2006) vorgenommen. Dabei wurden aus 30 frisch eingefrorenen Mammakarzinomen aus dem Gewearchiv des Instituts für Pathologie des Universitätsspitals Basel (Schweiz) jeweils drei Stanzbiopsien (Durchmesser: 0,6 mm) genommen und aus dem gewonnenen Gewebe die DNS extrahiert.

Die DNS-Proben wurden auf den Genchips hybridisiert und die Chips anschließend mit einem „Affymetrix GeneChip Scanner“ ausgelesen.

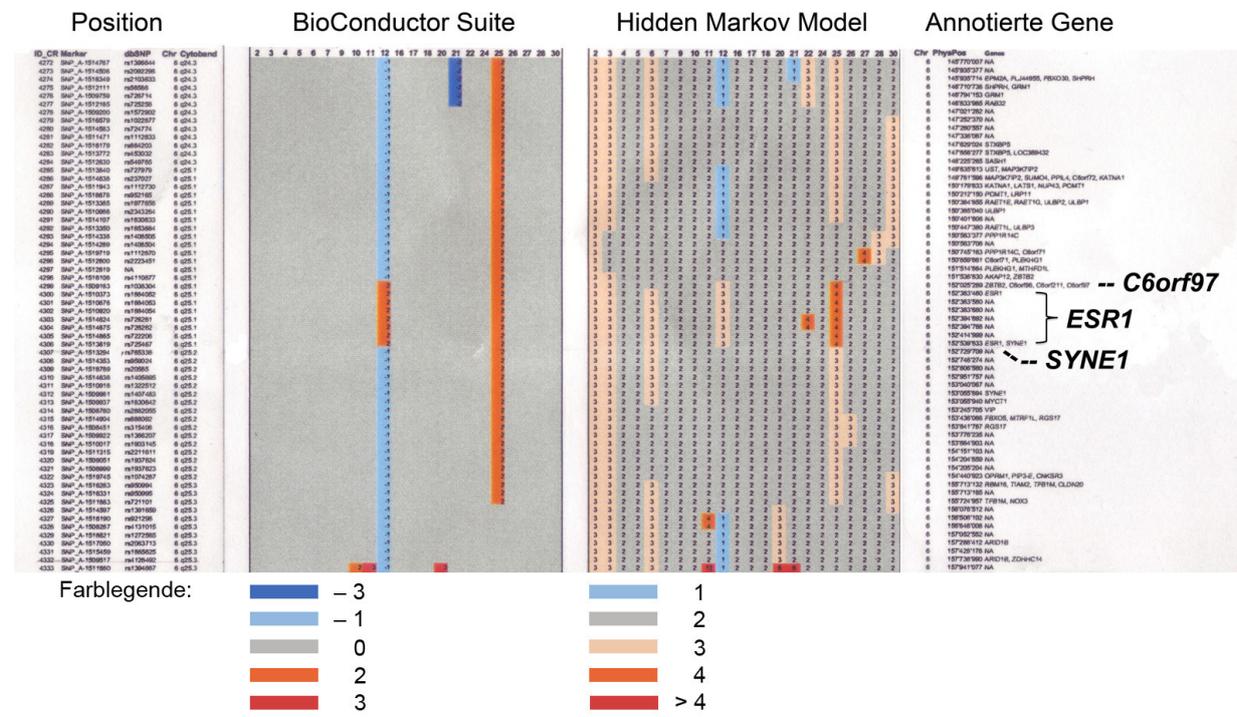
Die so entstandenen Rohdaten wurden den Anforderungen der Anleitung des „GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay“ (Affymetrix) entsprechend auf ihre Qualität hin geprüft.

22 der 30 Datensätzen entsprachen den Qualitätsanforderungen und wurden der weiteren bioinformatischen Datenanalyse unterzogen. Hierfür wurden die Daten mit Hilfe der „DChip software“ (Li and Wong 2001) (Version 2005), der Gebrauchsanleitung entsprechend, dem „pre-processing“ unterzogen und normalisiert. Die so berechneten Daten wurden in die „BioConductor Suite“ (Gentleman, Carey et al. 2004) des Programms R (R-Development-Core-Team 2005) importiert und mit einem für dieses Projekt eigens entwickelten Algorithmus analysiert. Hierbei wurden, für jede Probe und die einzelnen SNPs, die Werte unterhalb der 25. und oberhalb 75. Perzentile der Durchschnittswerte aller Proben als Referenz, also mit einer Trimmung von 50 %, ermittelt. Die hieraus berechneten log<sub>2</sub>-Ratios der Signalintensitäten wurden mit dem Programm „DNACopy package“ (Venkatraman 2004) der „Bio Conductor Suite“ (Gentleman, Carey et al. 2004) visualisiert. Hierbei wurden zusammenhängende Chromosomenabschnitte mit ähnlichem DNS-Gehalt berechnet und in zusammengefaßten Segment-Niveaus zusätzlich zu den einzeln wiedergegebenen SNP-Meßwerten dargestellt (**Abbildung 16**). Bereiche auf den Niveaus mit höherem DNS-Gehalt als im zuvor berechneten Referenzbereich für die normale Kopiezahl (Normalisierung), wurden als Regionen potentieller Genamplifikationen eingestuft.

Zusätzlich wurden die Signalintensitäten in einer sogenannten „heatmap“ farbig dargestellt (**Abbildung 17**).



**Abbildung 16** SNP-Segmentprofil einer Genchip-Analyse. Darstellung der Segmentniveaus (rot) und SNP-Meßwerte (schwarz) des Chromosoms 6 mit Kopiezahlgewinn, auf 6q25.1, bzgl. der acht SNPs von denen sieben *ESR1* repräsentieren (schwarzer Pfeil). Die einzelnen schwarzen Punkte entsprechen der Signalintensität eines Oligonukleotid-SNP-Kompartiments des Genchips. Die roten Linien stellen Segmentniveaus einer algorithmisch berechneten Profilebene dar, die Signalwerte solcher zusammenhängender SNP-Kompartimente in einem Mittelwert zusammenfaßt, welche sich von anderen Profilebenen in ihrem Durchschnittswert signifikant unterscheiden. Die Werte wurden mit CNAT kalkuliert und durch „DNACopy package“ visualisiert. Auf der X-Achse ist der Genchip-Index für die chromosomale Position aufgetragen. Abbildung nach (Ruiz 2006).



**Abbildung 17** Visualisierung der Affymetrix-Genchip-Daten bzgl. der beiden genannten Algorithmen. Die farbigen Längsbalken repräsentieren die Analysedaten bzgl. der genomischen Positionen der analysierten Proben. Die entsprechenden farbkodierten Werte (Farblegende) stehen für die Fluoreszenzintensität der SNP-Genchipsignale („BioConduktor Suite“) bzw. Genkopiezahlen („Hidden Markov Model“). Weitere Erläuterung siehe Text. Abbildung durch Christian Ruiz zur Verfügung gestellt, modifiziert.

Die schwarzen Punkte repräsentieren SNP-Signale des Affymetrix-Genchips. Die Werte wurden mit CNAT kalkuliert und durch „DNACopy package“ visualisiert. Auf der X-Achse ist der Genchip-Index für die chromosomale Position aufgetragen.

Bei zwei (9 %) der 22 Proben (Probe 12 und 25), die den in der Anleitung von Affymetrix beschriebenen Qualitätsanforderungen entsprachen, wurde so eine potenzielle Erhöhung der Kopiezahl des DNS-Bereichs, der das für den ER codierende Gen enthielt, identifiziert. In einer der beiden Proben (Probe 25) umfaßte das Amplikon einen Bereich von ungefähr 25 Megabasen (ungefähre Basenpositionen: 132.650.000-155.730.000). In der anderen Probe (Probe 12) hingegen umfaßte der amplifizierte Bereich nur 514 Kilobasen auf 6q25.1 (Basenpositionen: 152.025.289-152.539.833). Dies entspricht genau den sieben Oligonukleotiden, die sich auf dem verwendeten Genchip im Bereich des Gens *ESR1* und einem direkt angrenzenden SNP im Bereich von *C6orf97* befinden. Der Östrogenrezeptor-alpha ist also das einzige Gen, welches in dieser Region lokalisiert ist (Ruiz 2006).

Alternativ zur Berechnung mit „BioConductor Suite“ wurden die Genchip-Daten nach dem „pre-processing“ und der Normalisierung mit der „dChip software“ nach dem „Hidden Markov Model“ und einer Trimmung von 50 % berechnet. Die Daten wurden dann wieder mit „DNACopy package“ der „Bio Conductor Suite“ als Werte für Genkopiezahlen in einer „heatmap“ visualisiert.

Dieser Berechnungsmethode entsprechend zeigte sich, daß sich auch in Probe 25 das Maximum der gemessenen Werte genau auf die sieben SNPs, die *ESR1* repräsentieren und einen SNP in *C6orf97*, welcher direkt 3'-flankierend liegt, beschränkt.

## 1.6 Ziel der Arbeit, Arbeitshypothese und Fragestellung

Diese Arbeit ist Teil und Ergebnis eines Projekts, das zum Ziel hatte, bisher unbekannte klinisch relevante Genamplifikationen beim Mammakarzinom des Menschen zu finden.

In einer der vorliegenden Arbeit vorangegangenen Genchip-Studie (Affymetrix 10K SNP Array) der Dissertation von Christian Ruiz wurden ausgewählte Mammakarzinome im Hinblick auf Kopiezahlveränderungen von DNS-Abschnitten (Amplikons) untersucht und geeignet aufbereitete Daten generiert (Kapitel 1.5).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden, in der Zusammenarbeit mit Christian Ruiz, die Daten der Genchip-Studie hinsichtlich besonders interessanter Kopiezahlveränderungen von potentiell relevanten Gengruppen, die für die Krebsentstehung von Bedeutung sein könnten, ausgewertet. Um die nach der Genchip-Analyse vielversprechendsten der ausgewählten potentiellen Amplifikationen zu validieren und deren mögliche klinische Bedeutung

evaluieren zu können, sollten in einem zweiten Schritt, den die vorliegende Arbeit zum Gegenstand hat, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) (Kapitel 1.4.2) an Gewebe-Mikroarrays (engl.: „Tissue microarray“ (TMA)) durchgeführt werden (Kapitel 2.1). Hierfür sollten zunächst ein Test-Gewebekollektiv mit 175 Mammakarzinomen des histologischen Grades 3 und anschließend ein Kollektiv von über 2000 Mammakarzinomgeweben mit den dazugehörigen klinischen Folge-Daten der entsprechenden Patientinnen verwendet werden.

Vor allem bzgl. der Fragestellung nach dem Zielgen einer Amplifikation ist die Ermittlung der Ausdehnung der amplifizierten DNS-Sequenz von Bedeutung. Daher war eine Kartierung der als relevant eingestuften Amplifikationen vorgesehen (Kapitel 2.3.8). Des Weiteren ergab sich die Fragestellung nach der Validierung der durch die FISH-Methode identifizierten Amplifikationen mit einer weiteren Methode, der qRT-PCR (Kapitel 2.6.3).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewebekollektiv

Für die Gewebeuntersuchungen mittels der FISH-Methode wurden großenteils Gewebe-Mikroarrays (engl.: „Tissue microarray“ (TMA)) eingesetzt. Diese Technologie ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Kononen, Bubendorf et al. 1998; Schraml, Kononen et al. 1999; Moch, Kononen et al. 2001). Für die vorliegende Arbeit wurden TMA-Dünnschnitte von 4 µm Stärke verwendet. Der Durchmesser einer einzelnen Gewebeprobe beträgt bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten TMAs 0,6 mm. Anhand des übersichtlichen „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ (Kapitel 2.1.1.3) ist in **Abbildung 18** exemplarisch für die in dieser Arbeit verwendeten TMAs, eine Übersicht über den „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ und in **Abbildung 19** die vergrößerte Histologie einer Probe dargestellt.

#### 2.1.1 Gewebekollektiv Mamma

##### 2.1.1.1 Gewebekollektiv des „Amplifikations-Test-TMA“

Um die mit der Auswertung den Genchip-Daten (siehe Kapitel 1.5) erhaltenen Hinweise bzgl. der möglicherweise beim Mammakarzinomen in signifikantem Ausmaß vorhandene *ESRI*-Amplifikation zu validieren, wurde zunächst ein aus 171 Grad-3-Mammakarzinomen bestehender „Amplifikations-Test-Array“ („Amplifikations-Test-TMA“) mit der FISH-Methode analysiert. Hierfür wurde dieser TMA mit einer FISH-Sonde, die entsprechend dem pBAC-Klon RP11-450E24 (Version „Cancer 1G3“) (Kapitel 2.3) innerhalb des Gens *ESRI* lokalisiert ist, auf *ESRI*-Amplifikationen untersucht. Die hierfür verwendeten Gewebe stammten aus dem Paraffingewebe-Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

##### 2.1.1.2 Gewebekollektiv des Prognose- und Progressions-TMAs

Um das mit Hilfe des „Amplifikations-Test-TMAs“ validierte Vorkommen der *ESRI*-Amplifikation beim Mammakarzinom epidemiologisch bewerten und eine mögliche klinische Relevanz evaluieren zu können, wurde ein Gewebe-Array mit über 2000 Brustkrebsgeweben, der sogenannte „Brust-Prognose-TMA“, ebenfalls bzgl. *ESRI*-Amplifikationen, mit Hilfe der FISH-Methode ausgewertet. Dieser TMA und seine genaue Zusammenstellung ist in der Fachliteratur publiziert (Ruiz, Seibt et al. 2006).

Dabei ist für insgesamt 420 der Karzinom-Gewebeproben die Art der adjuvanten Therapie der entsprechenden Patientinnen bekannt. 261 Patientinnen erhielten lediglich eine Tamoxifen Behandlung ohne zusätzliche adjuvante zytotoxische Chemotherapie. Die Therapie erfolgte nach den derzeitig empfohlenen Standards über 5 Jahre. Weitere detailliertere Informationen bezüglich der therapeutischen Behandlung standen für die Datenerhebung nicht zur Verfügung.

Die klinische Therapie und diagnostische Bewertung der Patientinnen erfolgte im Zeitraum zwischen den Jahren 1985 und 2000 durch das Universitätsspital Basel (Schweiz), dem Frauenkrankenhaus Rheinfelden und dem Kreiskrankenhaus Lörrach.

Die klinischen Folgedaten der Patientinnen konnten durch Auskunft der weiter behandelnden Ärzte erhoben werden. Aus den Pathologieberichten wurden die Daten zur Stadieneinteilung, wie maximaler Tumordurchmesser, pT-Stadium und der Lymphknotenstatus (Anzahl untersuchter und Anzahl positiver Lymphknoten, pN-Stadium), gewonnen.

Um eine mögliche epidemiologische Bedeutung auch in nicht neoplastischem und prämaligmem Brustgewebe untersuchen zu können, wurde ein weiterer „Tissue microarray“ (TMA) analysiert. Dieser Array enthielt Proben aus 62 DCIS, 10 LCIS, 14 apokrinen Metaplasien, 27 intraduktalen Hyperplasien, 5 atypischen intraduktalen Hyperplasien, 22 Mastopathien, 31 Papillomen und 15 Fällen von sklerosierenden Adenosen.

Der „Brust-Prognose-TMA“ enthält 2197 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Mammakarzinome, die aus vier verschiedenen Kollektiven stammen. Die Verwendung der Gewebe und der entsprechenden Daten wurde durch die Ethikkommission des Universitätsspitals Basel genehmigt.

648 Tumore des TMAs stammen von Patientinnen, die aufgrund eines Mammakarzinoms am Chirurgischen Spital des Kantonspitals Basel, an der Frauenklinik des Kantonspitals Basel bzw. an der Frauenklinik Rheinfelden oder im Kreiskrankenhaus Lörrach operiert wurden und deren Tumormaterial am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel untersucht wurde. Von allen Patientinnen sind Daten zum weiteren Krankheitsverlauf, inklusive der angewandten Therapien und gegebenenfalls der Zeitpunkte des Auftretens von Rezidiven bzw. Metastasen sowie gegebenenfalls der Todeszeitpunkt und die Todesursache, bekannt. Darauf basierend ließen sich sowohl tumorspezifische als auch Roh-Überlebensraten ermitteln. 324 Tumore wurden am Institut für Pathologie des Stadtsitals Triemli in Zürich aufgearbeitet. Auch für diese Patientinnen lagen die Daten zu den angewandten Therapien und gegebenenfalls auch die Daten für die Zeitpunkte des Auftretens von Rezidiven sowie zu

den Todeszeitpunkten und der Todesursachen vor. Für diese Patientinnen konnte man so ebenfalls die tumorspezifischen und Roh-Überlebensraten bestimmen.

Zu den 785 Mammakarzinomen, die am Institut für klinische Pathologie in Basel untersucht wurden, liegen lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten, nicht jedoch zu den tumorspezifischen Überlebensraten vor. Auch zu den 446 Mammakarzinomen, die am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel aufgearbeitet wurden, konnten lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten erhoben werden, nicht jedoch zu den tumorspezifischen Überlebensraten.

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

Die histologischen Schnitte jedes Tumors wurden von einem der beiden Pathologen (Prof. Dr. med. J. Torhorst und Prof. Dr. med. G. Sauter) begutachtet, um den histologischen Tumortyp zu definieren und den histologischen Grad entsprechend der Einteilung von Bloom-Richard-Elston (BRE) festzustellen (Elston and Ellis 1991).

Die genaue Zusammensetzung des „Brust-Prognose-TMA“ nach Histologie, Tumorstadium, Nodalstatus und Tumorgrad ist im Zusammenhang zu den ER-IHC- und FISH-Ergebnissen im Anhang in **Tabelle 11** und **Tabelle 12** aufgeführt.

### 2.1.1.3 Gewebekollektiv für die Kartierung des *ESR1*-Amplikons

Mit Hilfe der 34 zunächst identifizierten *ESR1*-amplifizierten Karzinome des „Amplifikations-Test-TMAs“ wurde ein neuer TMA („*ESR1*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“) für die Kartierung des *ESR1*-Amplikons mittels FISH-Technik erstellt. Nur 26 dieser 34 Gewebeproben konnten in dem neuen „*ESR1*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ eingebracht werden, da 8 Gewebe nicht mehr für die TMA-Herstellung geeignet waren, weil nicht mehr ausreichend Tumormaterial im Gewebeblock zur Verfügung stand.

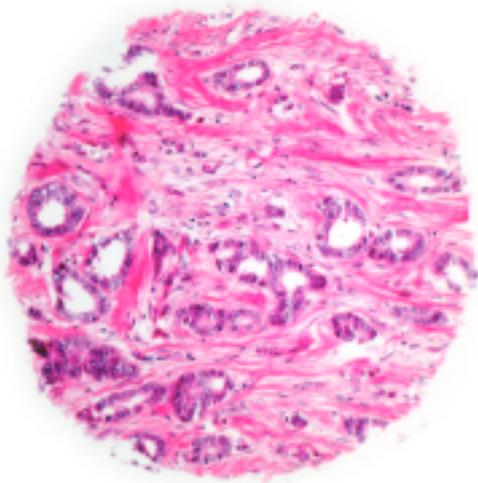
Als Kontrollgewebe wurden dem TMA zusätzlich 12 nicht amplifizierte Mammakarzinome hinzugefügt.

In **Abbildung 18** ist eine Übersicht über den „*ESR1*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ und in **Abbildung 19** die vergrößerte Histologie einer Probe dargestellt.



**Abbildung 18** Übersicht über den „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“.

Lichtmikroskopische Aufnahme (10×) eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten histologischen Dünnschnitts (4 µm). Der Durchmesser einer einzelnen Gewebeprobe beträgt bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten TMAs 0,6 mm. Abbildung in Zusammenarbeit mit M. Wendland.



**Abbildung 19** Vergrößerte Darstellung eines „Gewebespots“ des *ESRI*-Mapping TMA.

Lichtmikroskopische Aufnahme (100×) eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten histologischen Dünnschnitts (4 µm). Abbildung in Zusammenarbeit mit M. Wendland.

#### 2.1.1.4 Gewebekollektive für die qRT-PCR

Die für die verschiedenen qPCR-Experimente verwendeten DNS-Lösungen wurden aus folgenden Geweben isoliert.

##### **Gewebe für die qRT-PCR mit Geweben aus dem „ESRI-Amplifikations-Kartierungs-TMA“:**

Für die qRT-PCR mit Geweben aus dem „ESRI-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ (Kapitel 2.6) wurden entsprechend beschriebene Gewebe aus diesem TMA (siehe Kapitel 2.1.1.3) verwendet.

14 gemäß FISH-Analyse *ESRI*-amplifizierte Karzinome mit deutlich erkennbarer *ESRI*-Amplifikation, sowie 10 entsprechend analysierte Karzinome ohne erkennbare *ESRI*-Amplifikation wurden ausgewählt, deren Anteil an Tumorzellen (> 70 %) eine qRT-PCR zuließ (siehe dazu auch Kapitel 3.1.5.1). Dabei wurden hierfür auch sechs Gewebe ausgesucht, deren *ESRI*-Amplifikation sich entsprechend der Kartierung eindeutig auf die DNS-Sequenz von *ESRI* selbst beschränkt.

##### **Gewebe für die qRT-PCR mit einem alternativen Gewebekollektiv:**

Für qRT-PCR mit Geweben aus einem alternativen Gewebekollektiv (siehe auch Kapitel 3.1.5.2 und 4.4.2) wurde ein Gewebe-Array bestehend aus über 800 Mammakarzinomen mit der FISH-Methode auf *ESRI*-Amplifikationen untersucht. Es wurden unter den gemäß FISH-Analyse *ESRI*-amplifizierten Mammakarzinomen mit eindeutig erkennbarer *ESRI*-Kopiezahlvermehrung zufällig zehn Fälle ausgesucht. Als Kontrollgruppe dienten zehn weitere als nicht amplifiziert eingestuftes Gewebeprobe.

Die Gewebe des entsprechenden Arrays stammten aus einer privaten Praxis, die dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf angegliedert ist. Dieses Gewebekollektiv ist in der Dissertation von Stephanie Hofmann beschrieben (Hofmann 2010).

### 2.1.2 Gewebekollektiv Endometrium

Um *ESR1*-Amplifikationen im Krebs des Endometriums zu untersuchen, wurde ein TMA verwendet, der aus den primären Tumoren des Endometriums von 368 Patientinnen zusammengesetzt ist.

Das mittlere Patientinnenalter lag bei 69 Jahren (bei einer Spanne von 31 - 92 Jahren). Die originalen Überlebensdaten wurden entweder durch das Krebs-Register der Universität Basel oder von den behandelnden Ärzten der Patientinnen zu Verfügung gestellt. Die durchschnittliche Zeit mit Folgedaten betrug 20 Monate (Spanne 1 - 173). Es wurde Formalin-fixiertes (neutral-gepufferte wässrige 4 %ige Lösung), Paraffin-eingebettetes Tumormaterial verwendet.

Der pathologische Grad und der Nodalstatus wurden aus dem primären pathologischen Bericht entnommen und sind in **Tabelle 13** und **Tabelle 14** dargestellt. Die histologischen Tumortypen verteilten sich auf endometroide Karzinome (n = 304), seröse Karzinome (n = 26), Klar-Zell-Karzinome (n = 17), muköse Karzinome (n = 8) und Plattenepithelzellkarzinome (n = 3). In 17 weiteren Endometriumkarzinomen war der histologische Subtyp nicht spezifiziert.

HE-Schnitte aller Tumore wurden durch zwei Pathologen (Prof. Dr. med. Holger Moch und Prof. Dr. med. Luigi Terraciano) überprüft, um den histologischen Grad und Tumortyp zu bestimmen. Zu diesen Tumoren lagen keine Informationen zur Therapie vor.

Um die Studie auf Endometriumhyperplasien zu erweitern, wurden Großschnitte solcher Gewebe aus dem Archiv des Instituts für Pathologie in Hamburg ausgewählt und durch zwei Pathologen (PD Dr. med. Annette Lebeau und Dr. med. Dr. rer. nat. Tobias Grob) reklassifiziert.

Auf eine *ESR1*-Amplifikation wurden 19 Fälle komplexer atypischer Hyperplasien, 10 Fälle komplexer atypischer Hyperplasie, 10 Fälle komplexer Hyperplasie ohne Atypien und 14 Fälle einfacher Hyperplasie ohne Atypien untersucht.

### 2.1.3 Gewebekollektiv Ovar

Um *ESRI*-Amplifikationen im Krebs des Ovars zu untersuchen, wurde ein TMA verwendet, der aus den Primärtumoren von 428 Ovarialkrebspatientinnen zusammengesetzt ist.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen betrug 58,1 (Spanne 24 - 84) Jahre. Die originalen Überlebensdaten wurden entweder durch das Krebs-Register der Universität von Basel oder von den behandelnden Ärzten der Patientinnen zur Verfügung gestellt. Die durchschnittliche Zeit mit Folgedaten betrug 41,85 Monate (Spanne 1 - 210). Es wurde Formalin-fixiertes (neutral-gepufferte wässrige 4 %ige Lösung), Paraffin-eingebettetes Tumormaterial verwendet.

Der pathologische Grad und Nodalstatus wurden aus dem primären pathologischen Bericht entnommen. HE-Schnitte aller Tumore wurden durch einen Pathologen (Prof. Dr. med. Holger Moch) überprüft um den histologischen Grad und Tumortyp zu bestimmen. Die Zusammensetzung dieses Tumorgewebe-Mikroarrays ist in **Tabelle 15** aufgeführt.

## 2.2 Immunhistochemie

Beim Östrogenrezeptor handelt es sich um ein Protein, das relativ leicht immunhistochemisch zu detektieren ist. Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit der Antikörper NCL-L-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK) verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert und für 12 Minuten bei 120°C unter Druck in einem pH6-Citratpuffer (Retrievit 6 #BS-1006-00, BioGenex, San Ramon, CA) inkubiert. Nach dem Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte im verdünnten (1 : 1000) Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Um die Antikörperbindung nachzuweisen, wurde das „Vectastain ABC Elite“-System benutzt. Der Grad der Positivität der IHC-Färbung wurde nach Allred (Harvey, Clark et al. 1999) eingeteilt. Die ER-Färbung wurde in eine Skala von vier Intensitäten (0 - 3) unterteilt, der Anteil an positiven Tumorzellen wurde in fünf Stufen (1 - 5) unterteilt. Die Kombination beider Parameter, nach Allred, resultiert in einer 8 - Punkte-Skala, wobei alle Proben mit einer Punktzahl über 2 als ER-positiv gewertet wurden.

## 2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Zur Bestimmung der *ESR1*-Kopiezahl in den Geweben der verwendeten TMAs und Großschnitte, wurde eine zweifarbige FISH-Analyse eingesetzt. Hierfür wurden 4 µm starke TMA- bzw. Gewebegroßschnitte verwendet. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies wurde gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL) durchgeführt.

Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte, digoxigenierte pBAC-Sonde (mit BAC-Klon des RZPD, Deutschland) eingesetzt, deren humane genomische DNS-Sequenz analog zu einer entsprechenden Sequenz der interessierenden Region ist (*ESR1*, *ESR2*, *PGR* bzw. im Falle der Kartierung des *ESR1*-Amplikons, die entsprechenden *ESR1*-flankierenden Regionen, **Tabelle 10**). Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange, Vysis) verwendet. Die Markierung der selbst hergestellten DNS-Sonde erfolgte mittels „Nick-Translation“ mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen). Die hybridisierte Sonde wurde auf den TMA-Schnitten mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) detektiert. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt:

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

Um in dem Gewebekollektiv der zehn *ESR1*-amplifizierten Karzinome, welche für die qPCR mit *ASXL2* (bzw. *SOD2*) als Referenzgen verwendet wurden, diejenigen Gewebe zu identifizieren, in welchen die *ESR1*-Amplifikation auf *ESR1* begrenzt ist, wurden „Contig“-Sonden entsprechend der DNS-Sequenz der folgenden pBAC-Klone verwendet:

Für die 5'-*ESR1*-flankierende Sonde eine Kombination aus den pBAC-Klonen RP11-99N11 und RP11-108N8 sowie für die 3'-*ESR1*-flankierende Sonde eine Kombination aus den Klonen RP3-445H2 und RP11-809I23, deren Anteile an humaner DNS-Sequenz bzgl. einer Sonde jeweils aneinander angrenzen.

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

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

##### **Material:**

- pBAC-E. coli-Klon mit klonierter humaner genomischer DNS-Sequenz, (RZPD-„stabstock“-Kultur (Alle verwendeten Klone sind im Anhang in **Tabelle 10** aufgeführt)
- Kulturmedium: LB-Medium, Miller-Rezeptur (25g / l dH<sub>2</sub>O), autoklaviert  
(Luria Broth Base, powder (Miller's LB Broth Base))  
(Gibco-BRL / Invitrogen))
- Antibiotika: - Chloramphenicol: 34 mg / ml 100 % Ethanol (Sigma),  
- Kanamycin: 50 mg / ml (Sigma)

##### **Arbeitsablauf:**

- 10 ml LB-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben füllen
- Zugabe von 30  $\mu$ l Chloramphenicol-Lösung (= 0,1 mg / ml Endkonz.) bzw. 5  $\mu$ l Kanamycin (= 0,025 mg / ml Endkonz.)
- Animpfen des Mediums mit Abstrich aus der Stickskultur
- Inkubation der angeimpften Kultur für 2 d bei RT und 200 rpm im Schüttelinkubator
- Überimpfen von 10  $\mu$ l der Kultur in 10 ml frisches LB-Medium (+ 30  $\mu$ l Chloramphenicol-Lösung bzw. 5  $\mu$ l Kanamycin) im 100 ml Erlenmeyerkolben
- Inkubation der überimpften Kultur ü.N. bei 37°C oder erneut 2 d bei RT und 200 rpm im Schüttelinkubator

→ DNS-Extraktion

### **2.3.2 DNS-Extraktion für die FISH-Sondenherstellung**

Die DNS der bakteriellen Plasmide mit den einklonierten humanen DNS-Sequenzen, die auch aufgrund ihrer Größe artifizielle Bakterienchromosomen genannt werden (engl. „bacterial artificial chromosome“ (BAC), wurde inkl. der entsprechenden Insertionen aus humaner DNS aus den E. coli-Flüssigkulturen mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma QIAGEN nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

#### **Laborprotokoll: DNS-Extraktion aus einer pBAC-E. coli-Flüssigkultur**

##### **Material:**

- „QIAprep Spin Miniprep Kit“ mit „Lyse Blue“ der Firma QIAGEN
- Ethanol (absolut)

##### **Arbeitsablauf: DNS-Extraktion aus einer pBAC-E. coli-Flüssigkultur**

- 4 ml (2 × 2 ml) einer dicht gewachsenen pBAC-E. coli-Kultur im 2 ml Eppendorf-Röhrchen in Tischzentrifuge pelletieren (2 min, ca. 14.000 rpm (~ 18.000 × g))
- Pellet in 250 µl Puffer P1 (20 ml P1 + 200 µl (10 mg / ml) RNase A) vollständig resuspendieren (Puffer P1 im 4°C Kühlschrank aufbewahren)
- 250 µl Puffer P2 zur Suspension hinzufügen und vorsichtig 8 – 12 × invertieren (nicht länger als 5 min, Suspension muß vollständig blau werden)
- 350 µl Puffer N3 hinzufügen und sofort vorsichtig 8 – 12 × invertieren (Suspension, bzw. Niederschlag muß vollständig weiß werden)
- 30 min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge (ca. 14.500 rpm (~ 20.000 × g)) zentrifugieren
- Überstand in eine „QIAprep spin“-Säule (in einem „2 ml collection tube“) überführen
- 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge (~ 18.000 × g) zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule mit 500 µl Puffer PE beladen und 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge (~ 18.000 × g) zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule erneut mit 500 µl Puffer PE beladen und 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge (~ 18.000 × g) zentrifugieren, Durchfluß verwerfen

- erneut 1 min bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren, Durchfluß und „2 ml collection tube“ verwerfen
- „QIAprep spin“-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen setzen
- „QIAprep spin“-Säule mit 50  $\mu$ l 70°C warmen EB beladen (Elution-Buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
- 1 min inkubieren (RT)
- 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
- „QIAprep spin“-Säule aus dem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen entfernen und verwerfen.

Die Lagerung der DNS-Lösung kann für wenige Tage bei 4°C erfolgen. Über längere Zeit wird die DNS-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Die DNS-Konzentration der Proben wurde mit einem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma „Peqlab“ quantifiziert.

### 2.3.3 DNS-Markierung mittels „Nick-Translation“

Mit Hilfe der „Nick-Translation“ können durch eine enzymvermittelte molekularbiologische Reaktion biochemisch modifizierte, d.h. markierte Nukleotide in einen DNS-Doppelstrang eingebaut werden. Hierbei wird der betreffende DNS-Doppelstrang gleichzeitig in kleinere DNS-Doppelstränge fragmentiert. Da mit zunehmender Reaktionszeit nicht nur mehr markierte Nukleotide eingebracht werden, sondern auch die Häufigkeit der Fragmentierung zunimmt, entstehen mit fortschreitender Reaktionsdauer zunehmend kürzere markierte DNS-Abschnitte. Die Kontrolle der entstandenen Fragmentlänge erfolgt mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese und eines gleichzeitig aufgegebenen DNS-Fragmentlängenstandards.

Die „Nick-Translation“ wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Für die Reaktion wurden ca. 2 µg DNS in einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl eingesetzt. Das Protokoll des Kits wurde dahingehend modifiziert, daß nach Ablauf der durch den Hersteller vorgegebenen Inkubationszeit erneut Pol I-Dnase I-Enzym-Mix zugegeben und anschließend die Inkubation weitergeführt wurde.

#### Material:

- „Nick Translation System“ (Invitrogen)
- Digoxigenin 11-dUTP (1 mM) (Roche)
- Polymerase I (10 U / µl) (Invitrogen)
- ddH<sub>2</sub>O (Aqua ad injectabilia)

#### Pipettieransatz im 0,5 ml-Tube:

dNTP-Mix ohne dTTP (0,2 mM je Nukleotid)	5 µl
1 µl Digoxigenin-dUTP	1 µl
pBAC-DNS-Lösung (ca. 0,05 µg/µl entsprechend ca. 2 µg, höchstens 38 µl)	x – 38 µl
zu 38 µl pBAC-Human-DNS fehlendes Volumen ddH <sub>2</sub> O	x µl
Polymerase I-Dnase I-Mix (0,5 U / µl Pol I, 0,4 mU / µl Dnase I)	5 µl
Polymerase I	1 µl
<b>Gesamt-Ansatzmenge</b>	<b>50 µl</b>

**Arbeitsablauf: DNS-Markierung mittels „Nick-Translation“:**

- Ansatz gut durchmischen
- Inkubation für 90 min bei 15°C im „Thermocycler“
- Zugabe von 5  $\mu$ l Pol I-Dnase I-Mix, mit Pipette durchmischen
- erneute Inkubation für 15 min bei 15°C im „Thermocycler“
- Zugabe von 5  $\mu$ l Stop-Puffer (0,5 M EDTA, pH 8,0)
- mit dem Vortex-Gerät durchmischen, runterzentrifugieren

Die Lagerung der Sondenlösung kann für wenige Tage bei 4°C erfolgen. Über längere Zeit wird die Sondenlösung bei -20°C aufbewahrt.

Die Verdünnung von Nukleinsäurelösungen wurde mit ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

### 2.3.4 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

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

#### **Laborprotokoll:**

##### **Material:**

- demineralisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O)
- Ethanol (70 %, 80 %, 96 %)
- Pretreatment-Lösung: Vysis VP 2000 Pretreatment Reagent (NaSCN, pH 5,4)
- Protease-Lösung: 500 ml Vysis VP 2000 Protease Buffer (0,01 N HCl, pH 2,0)  
+ Vysis Protease I (Pepsin 250 mg)
- Xylol (J.T. Baker Chemicals)

##### **Arbeitsablauf: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung der Paraffin-Gewebe:**

- OT-fixierte Paraffin-Gewebeschnitte 3 × 10 min in Xylol
- und 2 × 5 min in 96 % Ethanol entparaffinieren.
- 3 min Lufttrocknung 48°C auf Heizplatte
- 15 min in „Pretreatment“-Lösung bei 80°C
- 2 min in dH<sub>2</sub>O waschen
- 150 min (bei Bedarf verkürz- bzw. verlängerbar auf bis zu 300 min, Gewebegroßschnitte: ca. 45 - 75 min) in Protease-Lösung bei 37°C
- 2 min in dH<sub>2</sub>O waschen
- 3 min in 70 % Ethanol
- 3 min in 80 % Ethanol
- 3 min in 96 % Ethanol
- 3 min Lufttrocknung 48°C auf Heizplatte

### 2.3.5 Hybridisierung

Für die Hybridisierungen wurden die selbst hergestellten DNS-Sonden (Kapitel 2.3.3) und eine kommerzielle Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht in dem herstellerseits mitgelieferten Hybridisierungspuffer verdünnt. Beide Sonden wurden in einem selbst hergestellten Hybridisierungsgemisch, welchem zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen („Basis-Hybridisierungsmix“), wie etwa repetitiver Sequenzen, humane Cot-DNS zugefügt wurde, auf die TMA-Schnitte gegeben und mit diesem für 10 min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Die Co-Denaturierung der Sonden- sowie der Tumor-DNS und die direkt anschließende Hybridisierung wurden in einem „HyBrite“-Hybridisierungsgerät (Abbott Diagnostics (Vysis)) durchgeführt.

#### Laborprotokoll der Hybridisierung:

##### **Material:**

- 20 × SSC (Vysis)
- COT-DNS (1 µg / µl) (Roche)
- Dextransulfat (Sigma-Aldrich)
- deionisiertes Formamid p.a. (Merck)

Zusammensetzung des Hybridisierungsgemischs:

„Basis-Hybridisierungsmix“	14 µl
Cot-DNS (1 µg / µl)	2 µl
markierte Sonden-DNS	4 µl
<b>Ansatz</b>	<b>20 µl</b>

**Arbeitsablauf für das Herstellen des „Basis-Hybridisierungsmix“:**

- 5 ml deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20 × SSC und 1 g Dextransulfat zusammen mit einem Magnetrührstäbchen in ein kleines Becherglas geben
- bei 60°C auf dem Heizrührer rühren bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- mit 2 M HCl auf pH 7 einstellen
- mit dH<sub>2</sub>O auf 7 ml auffüllen

Das „Basis-Hybridisierungsmix“ wird bei 4°C gelagert.

Die Hybridisierung der FISH-Sonde auf dem Gewebeschnitt wird folgendermaßen vorbereitet:

- 20 µl Hybridisierungsgemisch auf den Gewebeschnitt pipettieren, mit Deckgläschen eindeckeln (evtl. Luftbläschen herausstreichen), mit Fixogum versiegeln (trocknen lassen)
- Gewebeschnitt in „HyBrite“-Gerät legen und Programm starten: 10 min bei 72°C denaturieren und direkt anschließend ü.N. (bzw. bis zu 3 Tage) bei 37°C inkubieren

**Laborprotokoll: Waschen:**

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

**Material:**

- PBS-Puffer
- Waschpuffer: 2 × SSC, 0,3 % NP40, (pH 7,25) erstellt aus:
  - 2 × SSC aus 20 × SSC (Vysis): 66 g auf 250 ml dH<sub>2</sub>O
  - NP40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol) (Vysis)
  - dH<sub>2</sub>O
  - 1 M HCl (Merck)

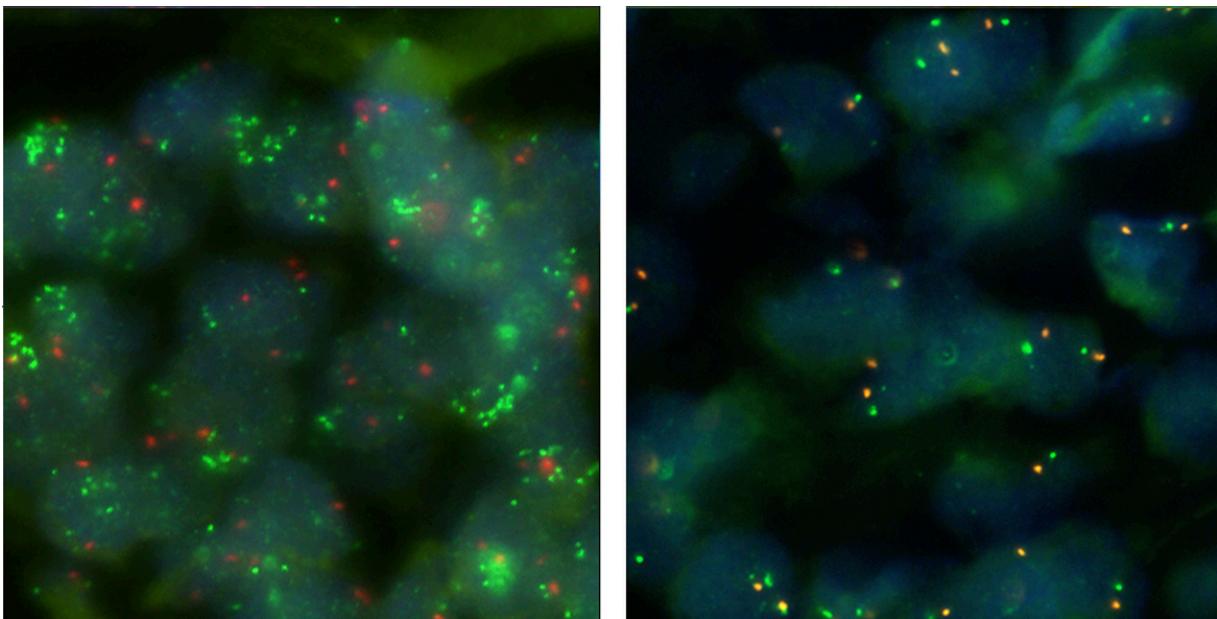
**Arbeitsablauf:**

- Gewebeschnitte aus dem „HyBrite“-Gerät nehmen und Fixogum und Deckgläschen entfernen
- Die Gewebeschnitte kurz in Waschpuffer (Raumtemperatur) stellen
- genau 2 min bei 72°C in Waschpuffer stellen
- in 1 × PBS stellen

### 2.3.6 Detektion

Um das Fluoreszenzsignal der Gensonden möglichst maximal zu verstärken und möglichst deutliche Signale zu erhalten, wurden die DIG-markierten Sonden mit einer Kaskade von drei jeweils folgend nacheinander bindenden Antikörper detektiert. Der sekundäre Antikörper wurde hierbei an den primären Anti-DIG-Antikörper gebunden. Der tertiäre Antikörper war gegen den sekundären Antikörper gerichtet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Die gebundene Sonde konnte so mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie indirekt visualisiert werden. Für diese Detektionsmethode wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche nach Arbeitsanleitung und Protokoll des Herstellers eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Gewebeschnitte unter Lichtausschluß luftgetrocknet und anschließend mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)) und einem 24 × 32 mm Deckgläschen eingedeckelt.

Beispiele für entsprechend detektierte *ESRI*-Amplifikationen sind in **Abbildung 6**, **Abbildung 12**, **Abbildung 20**, **Abbildung 25** (Mammakarzinom), **Abbildung 40**, **Abbildung 41** (Endometriumkarzinom) und **Abbildung 42** (Ovarialkarzinom) dargestellt.



**Abbildung 20** Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von *ESRI*-amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Mammakarzinome. Die *ESRI*-Kopien wurden mit der FISH-Methode grün fluoreszierend markiert. Das Zentromer 6 ist rot bzw. orange markiert. Eigene Aufnahme.

### 2.3.7 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

#### Laborprotokoll:

##### **Material:**

- Zeiss Axioskop Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss AxioCam MRc und Zeiss Axiovision Software

##### **Durchführung:**

Bei der Auswertung der FISH-Signale wurden stets Kopiezahlen erhoben.

Da eine exakte Kopiezahlbestimmung bei intrachromosomalen Genamplifikationen, bei denen die Gensignale in engen Signalclustern auftreten, häufig dadurch erschwert wird, daß die einzelnen Signale eines Clusters nicht immer eindeutig auseinandergehalten werden können, wurden die durchschnittlichen *ESR1*-Kopiezahlen eines Tumors anhand der Cluster mit differenzierbaren Signalen geschätzt.

Bei allen Tumoren wurde die auftretende Kopiezahlspanne notiert und der jeweilige Durchschnitt gebildet. Tumore mit einer durchschnittlichen Ratio der Kopiezahl (*ESR1* / Zentromer 6) von  $\geq 2$  wurden als amplifiziert, solche  $< 2$  aber  $> 1$  als Träger einer geringgradigen Kopiezahlerrhöhung („gain“) gewertet.

Es wurden nur solche Hybridisierungen als auswertbar gewertet, in denen ein repräsentativer Anteil an Zellkernen deutliche Gen- und Zentromersignale aufwies. Bei einem zu großen Anteil an Kernen ohne jegliches Gensignal bei gleichzeitigem Fehlen von eindeutigen Genkopiezahlvermehrungen wurde die Hybridisierung als nicht ausreichend angesehen und der Fall als nicht auswertbar eingestuft. Hybridisierungen, bei denen gespaltene Signale (engl.: „split signals“), „clusterartige“ oder konfluente Signalanhäufungen bei gleichzeitigem Erscheinen von „clusterartigen“ oder gespaltenen Zentromersignalen oder dem Fehlen deutlich erkennbarer Signale der Zentromersonde auftraten, wurde die Hybridisierung ebenfalls als nicht auswertbar (n.a.) eingestuft.

### **2.3.8 Kartierung genomischer DNS-Amplifikationen mittels der FISH-Methode**

Um die Ausdehnung der identifizierten *ESRI*-Amplifikationen zu bestimmen, wurden die *ESRI* beinhaltenen Kopiezahlvermehrungen mit der FISH-Methode in 24 Mammakarzinomen kartiert. Hierfür wurde ein entsprechender „Kartierungs-TMA“ (Kapitel 2.1.1.3) erstellt. Dieser wurde in Bereichen von jeweils ca. 1100 Mb in den 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *ESRI*, mit 30 FISH-Sonden entsprechend direkt aneinandergrenzender oder sich in ihrer DNS-Sequenz einander überlappender pBAC-Klone untersucht (Kapitel 3.1.3).

## 2.4 Lasermikrodissektion

Um die Kontamination der aus dem Tumorgewebe zu isolierenden DNS mit der DNS aus kontaminierenden Normalgewebe, das im Tumor enthaltenem ist, zu minimieren, werden Tumorzellen zur DNS-Isolation aus Tumorgewebschnitten mittels Mikrolaser mikrodisseziert. Dadurch soll ein Mindestgehalt von 70 % Tumor-DNS sichergestellt werden. Mit Hilfe der Mikrodissektion, d.h. der gezielten Isolierung von Zellverbänden (hier: Tumorzellen) aus dem Paraffingewebe-Dünnschnitt, wird der Anteil an Tumorgewebe in der anschließend molekularbiologisch zu analysierenden Gewebeprobe wesentlich erhöht.

### **Laborprotokoll der Mikrodissektion:**

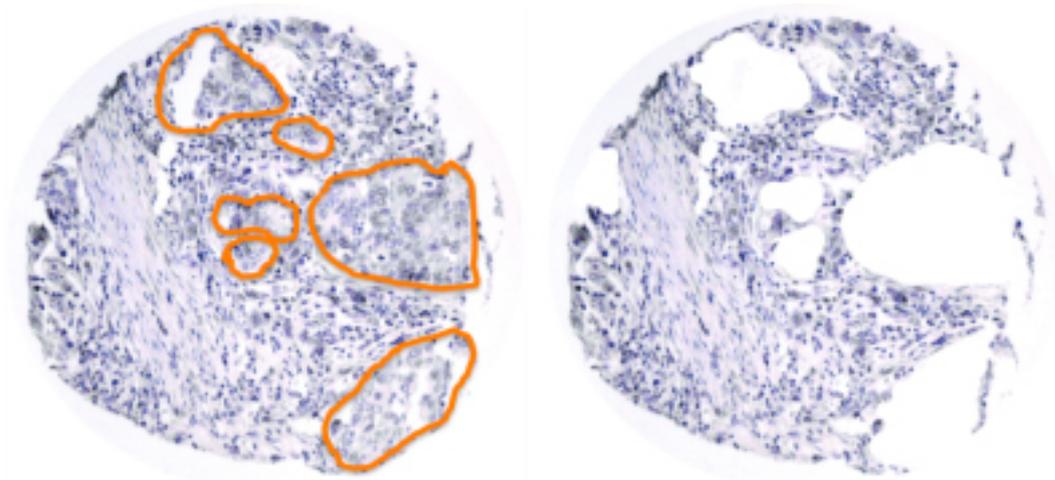
#### **Material:**

- Polyethylen-Membran beschichtete Objektträger („PALM FrameSlides“ der Firma Zeiss/P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland)
- Axiovert 200-M Mikroskop mit HAL-100 Leuchtmittel (Carl Zeiss MicroImaging GmbH)
- Mikrolaser zur Mikrodissektion mit MicroBeam für „optical trapping“, CryLas-FTSS 355-50 mit **PALM-Robo**-Software (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG)

#### **Arbeitsablauf der Mikrodissektion:**

Zur Mikrodissektion wird ein konventioneller histologischer Schnitt auf einen speziellen mit einer Polyethylen-Membran beschichteten Objektträger aufgezogen, konventionell entparaffiniert, entsprechend HE-gefärbt und am Lasermikrodissektions-Mikroskop bearbeitet. Mit einem manuell steuerbaren Laserstrahl werden hier Areale mit Tumorzellen unter mikroskopischer Kontrolle umfahren und so durch die Hitzeeinwirkung des Lasers aus dem Gewebe herausgeschnitten. Das Tumorgewebestück wird dann durch einen separaten und gezielt angesetzten einzelnen „Laserimpuls“ vom Objektträger direkt in ein Eppendorfröhrchen befördert.

Einen histologischen Gewebeschnitt vor- und nach der Lasermikrodissektion zeigt **Abbildung 21**.



**Abbildung 21** Lichtmikroskopische Aufnahmen (100×) eines histologischen Dünnschnitts (4  $\mu\text{m}$ ) einer TMA-Gewebeprobe ( $\varnothing$  0,6 mm) eines Mammatumors vor und nach der Mikrodissektion. Die in dieser Abbildung orange umrandeten Tumorbereiche (links) sind nach der Mikrodissektion (rechts) aus dem Gewebe isoliert. Abbildung in Zusammenarbeit mit E. Leipner (Leipner 2008).

## 2.5 Qualitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um sicherzustellen, daß es sich bei der humanen DNS-Sequenz in dem verwendeten pBAC-Klon um die entsprechende Sequenz des Gens *ESRI* handelt, wird die extrahierte DNS-Lösung als „Template“ einer qualitativen PCR eingesetzt, bei der ein Primerpaar verwendet wird, das in Exon 1 des Gens *ESRI* liegt. Das PCR-Produkt wird mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese qualitativ kontrolliert.

### 2.5.1 Qualitative Polymerase Kettenreaktion zur Überprüfung der pBAC-DNS

#### Laborprotokoll der qualitativen PCR:

##### **Material:**

Besondere Geräte:

„Eppendorf Mastercycler 5333 PCR-Thermocycler“

Verbrauchsmaterial:

- 10 × PCR-Puffer (inkl. 15 mM Mg<sup>2+</sup>) (Roche)
- PCR Nucleotide Mix: Ready-to-use premixed solution of PCR-Grade dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (10 mM je Nukleotid) (Roche)
- Primer *ESRI* forward 1 (28 pmol / $\mu$ l) (MWG Biotech) (zur Sequenz s. u.)
- Primer *ESRI* reverse 1 (44 pmol / $\mu$ l) (MWG Biotech) (zur Sequenz s. u.)
- AmpliTaqGold-Polymerase (5 U /  $\mu$ l) (Roche)
- 0,5  $\mu$ l pBAC-DNS des Klons RP11-450E24 (Version „Cancer 1G3“) (ca. 0,23 ng /  $\mu$ l)
- ddH<sub>2</sub>O (Aqua ad injectabilia) (Braun)

Als der DNS-Sequenzbereich, in dem die Primer bzw. das zu amplifizierende Stück liegen soll, wird Exon 1 gewählt, das durch das „*ESRI*-Insert“ in Klon RP11-450E24 (Version „Cancer 1G3“) beinhaltet wird. Die Sequenz des PCR-Produkts mit der Länge von 196 bp ist mit hervorgehobenen Primersequenzen folgend dargestellt:

**gagggtgtacctggacagcagca**agcccgccgtgtacaactaccccaggggcgccgcctacgagttcaacgccgcccgcgc  
aacgcgcaggtctacggctcagaccggcctccctacggccccgggtctgaggctcgccggttcggctccaacggcctggggggtt  
cccccc**actcaacagcgtgtctccga**

**Primerpaar *ESRI*-Exon1:**

- Primer 1 (Sense), 22 bp („*ESRI* forward 1“): 5'-gaggtgtacctggacagcagca-3'
- Primer 2 (Antisense), 22 bp (*ESRI* reverse 1): 5'-tcggagacacgctggtgagtg-3'

**Arbeitsablauf der Qualitativen PCR zur Überprüfung der verwendeten pBAC-Human-DNS:****Pipettieransatz im 0,2 ml-Tube:**

10 × PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (2 mM je Nukleotid, Endkonz.: 0,2 mM)	2,5 µl
Primer (forward 1) (1 pmol / µl (0,1 mM), Endkonz.: 0,1 pmol / µl)	2,5 µl
Primer (reverse 1) (1 pmol / µl (0,1 mM), Endkonz.: 0,1 pmol / µl)	2,5 µl
DNS-Matritze (engl.: „Template“) (entsprechend ca. 0,1 ng pBAC-DNS des Klons RP11-450E24 (Version „Cancer 1G3“))	0,5 µl
Polymerase I	0,25 µl
ad 25 µl mit ddH <sub>2</sub> O	
<b>Gesamt-Ansatzmenge</b>	<b>25 µl</b>

Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren.

Die Verdünnung von Nukleinsäurelösungen wurde mit ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde mit den gleichen Reagenzien parallel eine zweite PCR mit einem Reaktionsansatz ohne die Zugabe von „Template“-DNS durchgeführt.

Temperatur-Zeit-Profil für die qualitative PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	20 s	} 40
Primeranlagerung	56°C	20 s	
Strangverlängerung	72°C	20 s	
Strangverlängerung	72°C	5 min	1
Programmende	4°C	endlos	

## 2.5.2 Qualitative Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des Produkts der qualitativen PCR

Um den Erfolg der PCR und damit auch die richtige Länge des Produkts zu überprüfen, wird die in der PCR amplifizierte DNS auf ein Agarosegel parallel zu einem DNS Längenstandard aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen.

### Laborprotokoll Qualitative Agarose-Gelelektrophorese:

#### **Material:**

Besondere Geräte:

- Bio-RAD PowerPac 300 Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur (BioRad)
- 50 ml Gelelektrophoresekammer (Fläche: 6 × 7 cm ) mit Gelelektrophoresekamm zur Aussparung von Probestaschen mit den Ausmaßen von 1 mm (T) × 2,5 mm (B) × 6 mm (H)

Verbrauchsmaterial:

- 6 × „DNA Loading Dye“ Gelladepuffer (Fermentas)
- „MassRuler DNA Ladder Mix ready to use“-Gelelektrophorese-DNS-Längenstandard (Fermentas)
- NuSieve GTG Agarose (FMC Corporation)
- TAE- Puffer

Zusammensetzung des TAE- Puffers für die Gelelektrophorese:

- 10 × TAE:
- 24,2 g Tris HCl
- 5,71 ml Eisessig
- 10 ml EDTA 0,5 M, pH 8

ad 1000 ml

**Arbeitsablauf:**

- Agarose abwiegen und in Schott-Flasche füllen, TAE-Puffer hinzufügen + Rührfisch (1 g Agarose auf 100 ml 1 × TAE-Puffer = 1 %)
- In Mikrowelle (600 W) aufkochen
- Auf Magnetprüher so lange rühren bis Agarose restlos geschmolzen und mit 1 × TAE-Puffer vermischen
- 3 µl Ethidiumbromid (10 µg / µl) auf 100 ml TAE-Agarose (0,30 µg / 1 ml) hinzufügen

Für jeweilige Gelkammer entsprechendes Volumen flüssiges Agarosegel in Becherglas (mit Rührfisch) überführen erneut aufkochen, mit Ethidiumbromid versehen, auf Magnetprüher rühren und in Gelkammer gießen, solange das Gel flüssig ist.

Ladevolumen für Minigel (50 ml) pro Tasche :

$1 \text{ mm (T)} \times 2,5 \text{ mm (B)} \times 6 \text{ mm (H)} = 15 \text{ mm}^3 \rightarrow 15 \text{ µl} \rightarrow \text{ca. } 10 \text{ µl Probe zzgl. } 2 \text{ µl Ladepuffer}$

Um die PCR zu kontrollieren und das PCR-Produkt sichtbar zu machen, wurden 10 µl des unverdünnten PCR-Produktes und des Kontrollansatzes auf das 1%ige Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 100 V und 400 mA einer entsprechenden Elektrophorese unterzogen.

Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Tisch mit UV-Licht bestrahlt, um die nun fluoreszierend mit Ethidiumbromid eingefärbte DNS sichtbar zu machen und fotografisch zu dokumentieren.

## 2.6 Quantitative „Real Time“ Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur relativen Quantifizierung der *ESR1*-Kopien in den Proben wurden definierte DNS-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Als Testmaterial diente die genomische DNS der gemäß FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierten Tumorproben und als Vergleichsmaterial die gemäß FISH-Analyse nicht *ESR1*-amplifizierten Tumorproben (Kapitel 2.1.1.4). Die DNS für qRT-PCR wurde aus dem Material der entsprechenden Paraffinblöcke extrahiert (Kapitel 2.6.1 bzw. 2.6.2). Die qRT-PCR selbst erfolgte in 20 µl Ansätzen in einem „Multiwell Plate 96“ mit 0,2 ml Volumen pro Vertiefung. Die PCR-Amplifikation der Proben wurde mit Hilfe einer „TaqMan“-Sonde durch Detektion der Fluoreszenz im PCR-Reaktionsgefäß gemessen und innerhalb einer Probe mit einer oder mehreren der Vergleichssequenzen der Referenzgene *ESR2*, *SOD2* und *ASXL2* verglichen (statistische Auswertung siehe: Kapitel 2.7.2).

### 2.6.1 DNS-Extraktion aus formalinfixiertem Paraffingewebe

Die Extraktion der DNS für die qRT-PCR wurde für das nicht mikrodisezierte Gewebe mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ der Firma QIAGEN durchgeführt. Hierfür wurde das Material von fünf Paraffingewebeschnitten mit einer Schnittstärke von 4 µm zuvor entparaffiniert.

### 2.6.1.1 Entparaffinierung von formalinfixiertem Paraffingewebe

#### **Laborprotokoll zur Entparaffinierung von formalinfixiertem Paraffingewebe**

##### **Material:**

- Xylol (J.T. Baker Chemicals)
- Ethanol absolut (Merck)

##### **Arbeitsablauf: Entparaffinierung formalinfixiertem Paraffingewebe**

Das präparierte (geschnittene) Paraffingewebe wird in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt.

- 1 ml Xylol hinzufügen, vortexen, kurz runterzentrifugieren
- 10 min bei RT im Xylol inkubieren
- 2 min bei  $16,1 \times g$  (13.000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugieren
- Überstand entfernen
- erneut 1 ml Xylol hinzufügen, vortexen, kurz runterzentrifugieren
- wieder 10 min bei RT im Xylol inkubieren
- 2 min bei  $17,9 \times g$  (13.000 rpm in der Tischzentrifuge) zentrifugieren
- Überstand entfernen
- 1 ml Ethanol hinzufügen, vortexen
- 10 min bei  $17,9 \times g$  (13.000 rpm in der Tischzentrifuge) zentrifugieren
- Überstand entfernen
- erneut 1 ml Ethanol hinzufügen, vortexen
- wieder 10 min bei  $17,9 \times g$  (13.000 rpm in der Tischzentrifuge) zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Sediment (ü.N.) im Eppendorfröhrchen bei  $37^\circ\text{C}$  im Trockenschrank trocknen

## 2.6.1.2 DNS-Extraktion aus entparaffiniertem formalinfixiertem Gewebe

### **Laborprotokoll zur DNS-Extraktion aus entparaffiniertem formalinfixiertem Paraffingewebe**

#### **Material:**

- „QIAamp DNA Mini Kit“ (QIAGEN)
- Ethanol absolut (Merck)

#### **Arbeitsablauf: DNS-Extraktion aus entparaffiniertem formalinfixiertem Gewebe:**

- Bis zu 25 mg Gewebe in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen geben
- 180 µl Puffer ATL hinzugeben
- 20 µl Proteinase K hinzufügen, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- ü.N. bei 56°C im Thermoschüttler bei 1000-1200 U/min inkubieren
- kurz runterzentrifugieren
- erneut 10 µl Proteinase K hinzufügen, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- nochmals für 3h bei 56°C im Thermoschüttler bei 1000-1200 U / min inkubieren
- kurz runterzentrifugieren
- 200 µl Puffer AL hinzugeben, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- für 10 min bei 70°C im Thermoschüttler inkubieren
- kurz runterzentrifugieren
- 200 µl Ethanol (absolut) hinzugeben, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- den gesamten Ansatz inkl. des entstandenen Niederschlags in eine „QIAamp Spin“-Säule (in einem 2 ml „collection tube“) überführen
- 1 min bei 6000 × g zentrifugieren
- „QIAamp Spin“-Säule in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen und das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen
- 500 µl Puffer AW1 hinzugeben
- 1 min bei 6.000 × g zentrifugieren
- „QIAamp Spin“-Säule in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen und das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen
- 500 µl Puffer AW2 hinzugeben
- 3 min bei 20.000 × g zentrifugieren
- „QIAamp Spin“-Säule in ein frisches 2 ml Eppendorfröhrchen setzen

- und erneut 1 min bei  $20.000 \times g$  zentrifugieren,  
das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen
- „QIAamp Spin“-Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorfröhrchen setzen und  
das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen
- 200  $\mu$ l Puffer AE oder ddH<sub>2</sub>O hinzugeben
- 5 min bei RT inkubieren
- 1 min bei  $6.000 \times g$  zentrifugieren
- „QIAamp Spin“-Säule aus dem 1,5 ml Eppendorfröhrchen entfernen und verwerfen

Die Lagerung der DNS-Lösung kann für wenige Tage bei 4°C erfolgen. Über längere Zeit wird die DNS-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Die DNS-Konzentration der Proben wurde mit einem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma „Peqlab“ quantifiziert.

## **2.6.2 DNS-Extraktion aus lasermikrodisseziertem formalinfixiertem Paraffingewebe**

Die Extraktion der DNS für die qRT-PCR wurde aus lasermikrodisseziertem Gewebe (Kapitel 2.4) mit dem „QIAamp DNA Micro Kit“ der Firma „QIAGEN“ durchgeführt. Eine Entparaffinierung entfiel in diesem Arbeitsgang, da das Material schon vor der Mikrodissektion entparaffiniert wurde (Kapitel 2.4).

### **Laborprotokoll zur DNS-Extraktion aus lasermikrodisseziertem formalinfixiertem Paraffingewebe:**

#### **Material:**

- „QIAamp DNA Micro Kit“ (QIAGEN)

#### **Arbeitsablauf:**

- Das lasermikrodissezierte Gewebe befindet sich im Deckel eines „P.A.L.M. Adhesive-Tubes“
- Mit 1  $\mu$ l Proteinase K und 10  $\mu$ l ATL Puffer die Gewebepartikel aus dem Deckel lösen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführen, den Deckel anschließend 3  $\times$  mit 10  $\mu$ l ATL Puffer spülen, und diesen ebenfalls in das Röhrchen überführen (Gesamt Volumen 40  $\mu$ l ATL)

- Gemisch mit 5  $\mu$ l Proteinase K versetzen und ü.N. (mind. 16 h) bei 56°C inkubieren
- kurz runterzentrifugieren
- erneut 5  $\mu$ l Proteinase K hinzufügen, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- nochmals für 1 h bei 56°C inkubieren
- kurz runterzentrifugieren
- 50  $\mu$ l Puffer AL hinzugeben, vortexen und kurz runterzentrifugieren
- 50  $\mu$ l Ethanol (absolut) hinzugeben, vortexen (15 sec.), kurz runterzentrifugieren und das Gemisch 5 min bei RT inkubieren
- den gesamten Ansatz in eine „QIAamp MiniElute“-Säule (in einem 2 ml „collection tube“) überführen
- 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp MiniElute“-Säule in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen (das alte 2 ml „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen)
- 250  $\mu$ l Puffer AW1 auf die Säule geben
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp MiniElute“-Säule in ein neues 2 ml „collection tube“ setzen (altes „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen)
- 250  $\mu$ l Puffer AW2 auf die Säule geben
- 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp MiniElute“-Säule in ein frisches „collection tube“ setzen und erneut 3 min bei 14.000 rpm zentrifugieren (altes „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen)
- „QIAamp MiniElute“-Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorfröhrchen setzen (altes „collection tube“ mit dem Durchfluß verwerfen)
- 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O auf die Säule geben
- 5 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
- „QIAamp MiniElute“-Säule aus dem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen entfernen und verwerfen

Die Lagerung der DNS-Lösung kann für wenige Tage bei 4°C erfolgen. Über längere Zeit wird die DNS-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Die DNS-Konzentration der Proben wurde mit einem NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma „Peqlab“ quantifiziert.

### 2.6.3 Quantitative PCR (qPCR) zur Messung der *ESR1*-Kopiezahl

#### Laborprotokoll der qPCR zur Messung der *ESR1* Genkopiezahl:

##### **Material:**

- „Roche LightCycler 480 System“ mit „Roche LightCycler 480 Basic Software“, Software Version 1.2 (Roche)
- „Roche LightCycler 480 Multiwell Plate 96“, „white“ (Roche)
- „TaqMan Universal PCR Master Mix, NoAmpErase UNG“, 1-Pack, 1 x 5 mL, Part Number: 4324018 (Applied Biosystems)
- „Custom TaqMan Gene Expression Assay“ (20 ×) for *ESR1*, (Applied Biosystems)
- „Custom TaqMan Gene Expression Assay (20 ×) for *ESR2*“, (Applied Biosystems)
- „Custom TaqMan Gene Expression Assay“ (20 ×) for *SOD2*, (Applied Biosystems)
- „TaqMan Gene Expression Assay“ (20 ×) for *ASXL2* (Single exon assay), Assay ID: Hs00387993\_s1 (Applied Biosystems)
- Humane genomische Kontroll-DNS: „Human Genomic DNA Control (male gDNA)“ (10 ng / µl) (Invitrogen)
- ddH<sub>2</sub>O (Aqua ad injectabilia) (Braun)

Aus Paraffingewebe extrahierte DNS hat eine weitaus schlechtere Qualität als solche, die aus Frischgewebe oder Zellkulturen stammt. Daher wurden von der Proben-DNS ein entsprechend große Menge eingesetzt.

Aus dem nicht mikrodisezierten Brusttumorgewebe wurden 5 µl der genomischen DNS entsprechend ca. 200 ng, als „Template“-DNS verwendet. Von der genomischen Kontroll-DNS, die der Normalisierung diente, wurden 10 ng verwendet. Bei dem mikrodisezierten Geweben (Kapitel 2.1.1.4) wurden, aufgrund der geringen Menge und Konzentration, direkt 5 µl der extrahierten genomischen DNS (Kapitel 2.6.2) unverdünnt eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem „Thermocycler“ mit FAM-Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Das gewählte Temperatur-Zeit-Profil und die Primer- und Reportersequenzen der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“ sind im Arbeitsablauf aufgeführt.

**Arbeitsablauf der Quantitativen PCR (qPCR) mit dem TaqMan Real-Time PCR Assay:**

Zusammensetzung eines 20 µl TaqMan-Real-Time-PCR-Ansatzes:

„TaqMan Universal PCR Master Mix“ (2 ×)	10 µl
„TaqMan Gene Expression Assay“ (20 ×)	1 µl
DNS-Lösung	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
<hr/>	
Gesamt-Ansatzmenge	20 µl

Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren.

Zur Kontrolle wurde jeweils für jedes Referenzgen eine qRT-PCR-Ansatz ohne die Zugabe von DNS-Lösung („Template“) durchgeführt.

Temperatur-Zeit-Profil für die qualitative qRT-PCR:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	} 40
Primeranlagerung und Strangverlängerung	60°C	1 min	
→Fluoreszenzmessung			
Programmende	4°C	endlos	

Die DNS-Sequenzen der TaqMan-Primer und -Reportersonden der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“ sind in **Tabelle 1** und **Tabelle 2** beschrieben.

<b>Forward Primer Name</b>	<b>Forward Primer Seq.</b>	<b>Reverse Primer Name</b>	<b>Reverse Primer Seq.</b>
<i>gESR1-EX1-f</i>	GCCAACGCGCAGGTCTA	<i>gESR1-EX1-r</i>	CGCCGCAGCCTCAGA
<i>gESR2-EX5-f</i>	CGGCAAGGCCAAGAGAAGT	<i>gESR2-EX5-r</i>	AGGAGGGTGAGCACTAGCT
<i>gSOD2-f</i>	GGTGTCCAAGGCTCAGTT	<i>gSOD2-r</i>	AATTGTAAAGTGCCCCGTTTCCTT

**Tabelle 1** DNS-Sequenzen der TaqMan-Primer der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“

<b>Reporter Name</b>	<b>Reporter-Farbstoff</b>	<b>Reporter-Sequenz</b>	<b>Reporter-Quencher</b>	<b>Reporter-Typ</b>	<b>Design Strand</b>
<i>gESR1-EX1-p</i>	FAM	CTCCCCTACGGCCCC	NFQ	MGB	„Forward“
<i>gESR2-EX5-p</i>	FAM	CTGGACGCCCTGAGCC	NFQ	MGB	„Forward“
<i>gSOD2-p</i>	FAM	ACCAAGCCAACCCC	NFQ	MGB	„Reverse“

**Tabelle 2** DNS-Sequenzen der TaqMan-Reportersonden der „Custom TaqMan Gene Expression Assays“

## 2.7 Statistik

### 2.7.1 Epidemiologische Bewertung der *ESRI*-Amplifikation

Um den Zusammenhang zwischen dem histologischen Tumortyp, dem Tumorgrad, dem Tumorstatus und des *ESRI*-Amplifikationsstatus oder der ER-Expression darzustellen, wurde eine Kreuztabellen-Analyse und der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen dem Genamplifikationsstatus und dem Überleben der Patientinnen zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox-Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Überleben der Patientinnen gesetzt. Für die entsprechenden Überlebensanalysen war der Endpunkt die letzte klinische Kontrolle (rechtsseitiger Typ-III-Zensor) oder der Todeszeitpunkt der Patientin.

### 2.7.2 Auswertung der qRT-PCR

#### 2.7.2.1 Berechnung der relativen Kopiezahlverhältnisse

Um die mit der FISH-Methode als amplifiziert bewerteten Gewebeproben mit den als nicht amplifiziert ermittelten Gewebeproben mit Hilfe einer weiteren unanhängigen Methode zu vergleichen, wurden qRT-PCR-Experimente (Kapitel 3.1.5) durchgeführt. Dabei wurde ein Probenkollektiv im Triplikat untersucht (Gewebe aus dem „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“), während der Ansatz für das alternative Gewebekollektiv, aufgrund der geringen zu Verfügung stehenden DNS-Menge, lediglich im Duplikat ausgeführt wurde. Die Datenanalyse erfolgte entsprechend der Delta- $C_T$ - bzw. der Delta-Delta- $C_T$ -Methode (Pfaffl 2004).

Die Meßergebnisse der quantitative „Realtime“-PCR verlaufen entlang einer sigmoiden Kurve, die bis zum Wendepunkt einen exponentiellen Verlauf zeigt.

Die Intensität der Signale, mit Hilfe derer der zyklische Reaktionsverlauf detektiert wird, ist zu Beginn so gering, daß sich die Kurve erst verzögert meßbar an einem bestimmten Punkt signifikant von den vorhandenen Hintergrundsignalen unterscheidet. Aus der Anzahl der Zyklen, nach denen dieses meßbare Hervortreten schließlich erfolgt, ergibt sich der  $C_T$ -Wert. Dieser Wert ist eine sich aus dem praktischen Ereignis der Signalmessung und somit aus der sich ergebenden, in diesem Bereich kontinuierlich exponentiell verlaufenden Kurve, theoretisch errechnete Kennzahl. Sie kann also auch den Wert unnatürlicher Zahlen annehmen.

Relative Kopiezahlverhältnisse von verschiedenen Zielgenen oder Transkripten der gleichen Probe errechneten sich bei der qRT-PCR durch die Differenzen der  $C_T$ -Werte ( $C_T$ -Zielgen -  $C_T$ -Referenzgen =  $\Delta C_T$ ) beider Messungen. Entsprechend eines, auf einer Kopiezahlverdopplung basierenden Reaktionsverlaufs, errechnet sich das relative Kopiezahlverhältnis nach der Formel  $2^{-\Delta C_T}$  (relative Quantifizierung, RQ oder auch Ratio).

Entsprechend berechnet sich das relative Kopiezahlverhältnis zwischen zwei verschiedenen Proben bzw. Gruppen von Proben durch die Differenz der jeweiligen  $\Delta C_T$ -Werte bzw. der arithmetischen Mittel ihrer jeweiligen  $\Delta C_T$ -Werte ( $\Delta C_T$ -Probe -  $\Delta C_T$ -Kontrolle =  $\Delta \Delta C_T$ ) nach der Formel  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ . Voraussetzung dabei ist die Verwendung des selben Referenzgens für alle Proben.

Für jede Probe wurde durch die Geräte-Software ein  $C_T$ -Wert ermittelt. Für die statistischen Berechnungen wurden aus den beiden  $C_T$ -Werten der Replikate die arithmetischen Mittelwerte gebildet.

Je nach Experiment wurden die qPCR-Ansätze in Duplikaten oder Triplikaten angesetzt. Bei den Triplikaten wurden bei den  $C_T$ -Werten sogenannte Ausreißer entfernt. Als Ausreißer wurden einzelne  $C_T$ -Werte definiert, welche außerhalb des Vertrauensintervalls lagen.

In Anlehnung an eine übliche solche Intervalldefinition, dem Median +/- 4 MAD (MAD = mittlere absolute Abweichung vom Median), wurden zur Berechnung der potenzielle Ausreißerwert aus dem Triplikat ausgeschlossen und anstelle des Intervalls Median +/- 4 MAD der Mittelwert der beiden übrigen beiden Triplikat-Werte +/- die zweifache Differenz der beiden Werte gewählt. Der potenzielle Ausreißerwert wurde also ausgeschlossen, wenn die Abweichung dieses Wertes vom Median der beiden anderen doppelt so groß war wie der Unterschied zwischen den beiden anderen Werten, aus denen der Median gebildet wurde.

Zudem wurden Messungen von Proben ausgeschlossen bzw. verworfen, bei denen die Standardabweichung, bzw. die Differenz der  $\Delta C_T$ -Werte aller, bzw. beider Replikate (Triplikate bzw. Duplikate) den Wert  $\geq 1$ , entsprechend einer Kopiezahlverdoppelung, erreicht.

### 2.7.2.2 Normalisierung der relativen Kopiezahlverhältnisse aus der qRT-PCR

In den beiden verschiedenen PCR-Experimenten wurden die relativen Kopiezahlverhältnisse mit zwei verschiedenen Verfahren normalisiert.

#### **Normalisierung der Proben mit Hilfe einer Normalstandard-DNS:**

Mit jedem  $\Delta C_T$ -Wert der Proben wurde zum  $\Delta C_T$ -Wert der Normalstandard-DNS (Kapitel 2.6.3) der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert gebildet. Dieser wurde in die Formel  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  eingesetzt und so das auf die Standard-DNS bezogene relative Kopiezahlverhältnis errechnet.

#### **Normalisierung des arithmetischen Mittels der Kontrollgruppe auf den Wert 1:**

Die entsprechend der  $C_T$ -Werte der Replikate einer jeden Gewebeprobe berechneten relativen Kopiezahlverhältnisse (Ratios) wurden anhand der Ratios der in der FISH-Analyse nicht amplifizierten Gewebeproben normalisiert. Die Normalisierung wurde sowohl für den Median als auch für den Mittelwert berechnet. Hierfür wurde aus allen mittleren Ratios der Replikate jeder der nicht amplifizierten Gewebeproben der Median bzw. der Mittelwert gebildet und dieser auf den Wert 1 gesetzt. Die Normalisierung aller mittleren Ratios erfolgte mit Hilfe des resultierenden Korrekturfaktors.

Die relative Quantifizierung, also die Berechnung der Ratios der Kopiezahlen der Zielgene zu den Kopiezahlen des Referenzgens mit der Hilfe der Formel  $2^{-\Delta C_T}$  bzw.  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , geht von einer optimalen und identischen Effizienz des PCR-Verlaufs aller Proben, also einer Verdoppelung der DNS-Menge in jedem Zyklus, aus. Die reale Effizienz liegt selbst unter optimalen Reaktionsbedingungen etwas niedriger, ist jedoch bei allen verwendeten „Applied Biosystems-Assays“ ähnlich (nach Angaben des Herstellers „Applied Biosystems“ sogar gleich) und wird aus Gründen der vereinfachten Berechnung in der vorliegenden Arbeit somit als den Wert 2 annehmend behandelt.

### 2.7.2.3 Statistische Auswertung der qPCR mit dem U-Test

Zur statistischen Auswertung der qRT-PCR-Experimente wurde zum Vergleich der gemäß FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierten Gewebe mit der jeweiligen Kontrollgruppe aus gemäß FISH-Analyse nicht *ESR1*-amplifizierten Geweben, der zweiseitige U-Test nach Wilcoxon bzw. Mann und Whitney eingesetzt. Das Ergebnis der qRT-PCR bzgl. des alternativen Gewebekollektivs wurde exemplarisch mit Hilfe eines Box-Plots dargestellt (

Abbildung 33).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *ESRI*-Amplifikationen beim Mammakarzinom

##### 3.1.1 Häufigkeit und Typ der *ESRI*-Amplifikation und ihre Verteilung auf die histologischen Subtypen

Zur Validierung der Genchip-Daten (Kapitel 1.5) wurde der „Amplifikations-Test-TMA“ (siehe Kapitel 2.1.1.1) mittels FISH-Analyse auf *ESRI*-Amplifikationen untersucht (siehe Kapitel 2.3). 151 der 171 Mammakarzinome konnten erfolgreich analysiert werden. Die verbleibenden 20 Gewebeproben waren nicht auswertbar, weil entweder der „Gewebespot“ fehlte oder kein Signal der FISH-Sonde in den Zellkernen zu erkennen war.

Insgesamt 34 der 151 (22,5 %) analysierbaren Gewebeproben zeigten eine *ESRI*-Amplifikation der HSR-Form mit „clusterartig“ erscheinender Anordnung der durch die FISH-Sonden erzeugten Genkopie-Signale.

Da nach dieser Analyse des „Amplifikations-Test-TMAs“ mit einem häufigen Auftreten der *ESRI*-Amplifikation zu rechnen war, wurde der Prognose- und Progressions-TMA analysiert. In 1739 (79 %) der 2197 Mammakarzinome, die sich auf dem Prognose- und Progressions-TMA befinden, konnte der *ESRI*-Amplifikationsstatus bestimmt werden. 458 Fälle waren nicht analysierbar, da die „Gewebespots“ entweder keine Tumorzellen enthielten, die Hybridisierungsqualität nicht ausreichte oder ganze „Gewebespots“ während des Schneide- oder Behandlungsprozesses verloren gegangen waren. Die gemäß den in Kapitel 2.3.7 definierten Kriterien erfolgte Auswertung ergab in 358 (20,6 %) von 1739 analysierbaren Gewebeproben Amplifikationen des Gens *ESRI*. In weiteren 266 (15,3 %) Gewebeproben erfüllte das Kopiezahlverhältnis von *ESRI*-Kopiezahl zu Zentromerkopiezahl die Kriterien eines geringgradigen *ESRI*-Kopiezahlzugewinns („gain“). In 27 Fällen (1,6 %) ergab die FISH-Analyse mit deutlich weniger *ESRI*-Signalen als Signalen des Zentromers 6 eine monoallelische Deletion eines *ESRI*-Allels in zumindest einem Teil der Tumorzellen.

**Abbildung 20** zeigt Beispiele *ESRI*-amplifizierter und nicht *ESRI*-amplifizierter Tumorzellen. Die meisten amplifizierten Fälle zeigten eine traubenförmige, also „clusterartige“ Anordnung, oft sehr dicht beieinander liegenden *ESRI*-Kopien. Das läßt darauf schließen, daß es sich um intrachromosomale Amplifikationen handelt. Dieser Amplifikationstyp wird auch als HSR-Typ bezeichnet (engl.: „homogeneously staining region“), da sich solche Regionen aufgrund der sich wiederholenden Sequenzen auf Metaphasechromosomen homogen anfärben (siehe Kapitel 1.3.1). In den meisten Fällen bewegten sich die Kopiezahlen der *ESRI*-Amplifikation typischerweise in einem relativ

geringem Maß von 5 - 6 Genkopien auf „low level“-Niveau (siehe auch **Abbildung 6** und **Abbildung 12**).

Amplifikationen höherer Kopiezahl („high level“) ( $\geq 10$  Signale pro Tumorzelle) wurden in 18 % der amplifizierten Fälle gefunden. Die Tumore mit einer erhöhten *ESR1*-Kopiezahl (Amplifikationen und „gains“) waren signifikant mit einem geringen Tumorgrad (engl.: „low grade“) ( $p < 0,0001$ ) und der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen, also einem Nodalstatus (pT) von 0 ( $p < 0,05$ ) assoziiert. Auch bei den histologischen Subtypen ergab sich eine spezifische Verteilung. So war der Anteil an Geweben mit Amplifikationen bei den medullären Karzinomen (2,0 %) im Vergleich zu duktalem (21,5 %,  $p < 0,0001$ ), lobulären (19,3 %,  $p < 0,0001$ ) und tubulären (18,6%,  $p < 0,0009$ ) Karzinomen verhältnismäßig klein. Auffällig war im Gegensatz dazu der hohe Anteil an Geweben mit Amplifikationen (35,6 %,  $p = 0,0337$ ) in muzinösen Karzinomen. Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten *ESR1*-Kopiezahl und dem histologischen Subtyp des Mammakarzinoms ist im Anhang in **Tabelle 12** zusammenfassend dargestellt. Amplifikationen wurden auch in nicht neoplastischen und präkanzerösen Läsionen gefunden. Bei diesen Geweben waren die Amplifikationen in Papillomen (8 / 22, 36 %) und in duktalem Carcinoma in situ (DCIS) (14 / 40, 35 %) besonders häufig feststellbar. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Tabelle 3** dargestellt.

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

**Tabelle 3** Prävalenz der *ESR1*-Kopiezahlvermehrungen in normalem und prämaligem Gewebe

### 3.1.2 Vergleich mit der ER-Expression

Der Prognose- und Progressions-TMA wurde ebenfalls immunhistochemisch bzgl. der ER-Expression analysiert. In 2018 (92 %) von 2197 Fällen konnte der ER-Status bestimmt werden. 179 Tumore waren nicht analysierbar, da die „Gewebspots“ entweder keine Tumorzellen enthielten oder ganze „Gewebspots“ fehlten. In 1546 der 2018 (76,6 %) analysierbaren Tumorgewebe konnte zumindest eine schwache ER-Expression nachgewiesen werden.

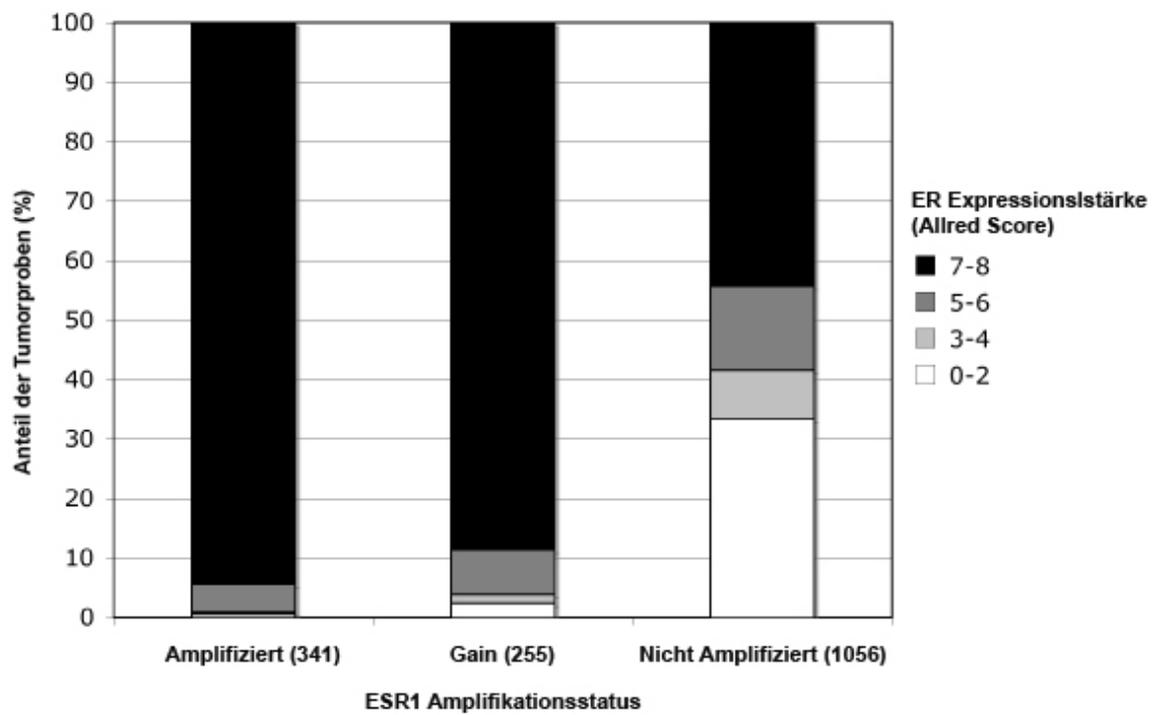
Die ermittelte ER-Expression ist mit geringem Tumorgrad (G1,  $p < 0,0001$ ) und geringem Nodalstatus (pT1,  $p = 0,0020$ ) der Mammakarzinome assoziiert. Der Zusammenhang zwischen ER-Expression und der Art des Mammakarzinoms ist in **Tabelle 11** zusammengefaßt.

Die ermittelte *ESRI*-Amplifikation ist hochsignifikant mit der ER-Expression assoziiert ( $p < 0,0001$ ). Fast alle als amplifiziert eingestuft Fälle wiesen im anschließenden Vergleich eine starke ER-Protein Expression auf.

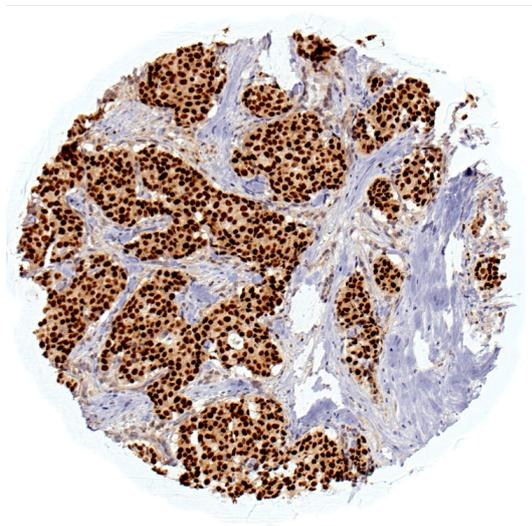
Von 341 Mammakarzinomen mit identifizierter *ESRI*-Amplifikation zeigten 339 (99 %) eine ER-Expression. 94 % wiesen mit 7 - 8 Punkten (nach Allred) einen sehr hohen und 5 % mit 5 - 6 Punkten einen hohen Expressionsgrad auf (Harvey, Clark et al. 1999). Ähnliches trifft auch für die Tumore zu, in denen ein geringer Zugewinn der *ESRI*-Kopiezahl (Ratio  $< 2$ ) ermittelt wurde und die daher als „gain“ eingestuft wurden. Diese zeigten in 88,6 % aller Gewebeproben eine sehr starke und in insgesamt 96 % aller Gewebeproben eine mindestens starke ER-Expression (5 - 8 Punkte nach Allred). Von den gemäß FISH-Analyse als nicht amplifiziert eingestuften Gewebeproben zeigten 44,3 % eine sehr hohe und insgesamt 58,4 % der Proben eine mindestens starke ER-Expression (5 - 8 Punkte nach Allred) (siehe auch **Tabelle 4** und **Abbildung 22** und **Abbildung 23**).

<i>ESRI</i> -FISH-Ergebnisse		ER-IHC-Ergebnisse („Allred Score“)			
	n	0 - 2 (%)	3 - 4 (%)	5 - 6 (%)	7 - 8 (%)
nicht amplifiziert	1056	33,3	8,2	14,1	44,3
„gain“	255	2,4	1,6	7,5	88,6
amplifiziert	341	0,6	0,3	4,7	94,4

**Tabelle 4** Vergleich von *ESRI*-Amplifikation und ER-Immunhistochemie



**Abbildung 22** Relation der *ESR1*-Amplifikation zur ER-Überexpression. Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon.



**Abbildung 23** Durchlichtmikroskopische Aufnahme (100 $\times$ ) eines immunhistologisch gefärbten Dünnschnitts (4  $\mu$ m) Immunhistochemie einer einzelnen Mammatumor-Gewebeprobe („spot“) eines TMA-Gewebeprobe ( $\emptyset$  0,6 mm). Das ER-Protein ist im Zellkern braun angefärbt. Abbildung von R. Simon zur Verfügung gestellt.

### 3.1.3 Kartierung des *ESRI*-Amplikons

Der aus *ESRI*-amplifizierten Geweben des „Amplifikations-Test-TMA“ erstellte „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ (siehe Kapitel 2.1.1.3) wurde zunächst erneut mit der *ESRI*-FISH-Sonde, entsprechend dem pBAC-Klon RP11-450E24 („Version Cancer 1G3“), untersucht. Dabei bestätigte sich der in der Untersuchung des „Amplifikations-Test-TMA“ ermittelte Amplifikationsstatus der Gewebe.

#### 3.1.3.1 Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit

24 der 26 Gewebeproben, die gemäß der FISH-Analyse des „Amplifikations-Test-TMA“ als *ESRI*-amplifiziert und alle 12 Kontrollgewebe, die entsprechend als nicht *ESRI*-amplifiziert eingestuft wurden, waren auf dem „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ mit allen 28 FISH-Sonden für die Kartierung auswertbar. Zwei der nach der FISH-Analyse des „Amplifikations-Test-TMA“ als *ESRI*-amplifiziert eingestuften Gewebe konnten nicht analysiert werden, da zu wenig analysierbares Gewebematerial auf den Array-Gewebeschnitten vorhanden war.

Die FISH-Analyse für die Kartierung des *ESRI*-Amplikons wurde mit einigen Sonden wiederholt durchgeführt, um für Gewebe mit zuvor nicht auswertbaren Hybridisierungen (Kapitel 2.3.7) ein Ergebnis zu generieren und um die Reproduzierbarkeit des Hybridisierungsergebnisses zu überprüfen. Anhand der Hybridisierungen einer Sonde, mit der bei beiden Hybridisierungen eine relativ hohe Auswertbarkeit erreicht wurde und einer Sonde, mit der bei beiden Hybridisierungen eine unterschiedlich hohe Auswertbarkeit erreicht wurde, ließ sich die Reproduzierbarkeit der Kartierung mit der FISH-Methode abschätzen. Im Ergebnis zeigten sich dabei zwar geringe, aber keine bedeutenden Unterschiede hinsichtlich des detektierten Status der Genkopiezahl (nicht amplifiziert, „gain“, amplifiziert). Die Ergebnisse dieser Mehrfachuntersuchungen sind in **Tabelle 5** aufgeführt. Die Unterschiede in den Ergebnissen beider Hybridisierungen, bzgl. der auswertbaren Gewebe, ergeben sich bzgl. Klon RP11-130P11 durch jeweils verschiedene nicht auswertbare Gewebehybridisierungen und in einem Fall durch die Bewertung eines zuvor als „gain“ eingestuften Falls als Amplifikation in der Wiederholung. Der Fall wurde nach Reanalyse beider TMA-Gewebeschnitte als „gain“ in das zusammenfassende Endergebnis übernommen.

Bzgl. der Reproduktion der Ergebnisse mit der Sonde entsprechend Klon RP11-434E7 konnten nach Reanalyse beider TMA-Gewebeschnitte alle Gewebe erfolgreich ausgewertet werden und insgesamt 4 „gains“ und 2 Amplifikationen festgestellt werden. Die Unterschiede in den Ergebnissen beider Hybridisierungen bzgl. der auswertbaren Gewebe ergeben sich

durch jeweils nicht auswertbare Gewebe. Zwei Fälle, die bzgl. der Sonde entsprechend Klon RP11-434E7 bei der ersten Analyse als „normal“ eingestuft wurden, wurden in der zweiten Auswertung als „gain“ eingestuft. Diese Ungenauigkeit bei der Reproduzierbarkeit bzgl. der Sonde entsprechend Klon RP11-434E7 könnte auf die ungewöhnlich kurze Sequenz der Sonde zurückzuführen sein.

Sonde	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 1+2
RP11-130E4	12 normal 2 „gains“ 15 Amplifikationen 7 n.a.	12 normal 1 „gain“ 18 Amplifikationen 5 n.a.	12 normal 2 „gains“ 19 Amplifikationen 3 n.a.
RP11-434E7	23 Normal 2 „gains“ 2 Amplifikationen 10 n.a.	30 Normal 3 „gains“ 1 Amplifikationen 2 n.a.	30 Normal 4 „gains“ 2 Amplifikationen

**Tabelle 5** Reproduzierbarkeit der FISH-Analyse

Bis auf vier der 30 Abschnitte der chromosomalen Region 6q25 konnten alle ausgewählten und durch die entsprechenden pBAC-Klone repräsentierten chromosomalen Bereiche mit entsprechenden DNS-Sonden hybridisiert und analysiert werden. Für die Regionen entsprechend der pBAC-Klone RP1-236H13, RP3-404G5, RP11-133I21 und RP1-200K18 konnte keine Sonde hergestellt werden, da der zugehörige pBAC-Klon nicht erhältlich war.

### 3.1.3.2 Ausdehnung der *ESR1*-Amplikons

Die Ausdehnung der Amplifikation im Bereich der chromosomalen Region 6q25 ist für die 24 verschiedenen erfolgreich analysierten Gewebe in **Abbildung 24** dargestellt.

Die Kartierung des *ESR1*-Amplikons mit Hilfe der FISH-Analyse ergab, daß sich, im Rahmen der durch die methodisch limitierten Auflösung der Kartierung bedingten eingeschränkten Feststellbarkeit, die Ausdehnung des Amplikons in 12 der 24 Tumore, also der Hälfte der untersuchten Fälle, nachweisbar auf die Ausdehnung des Gens *ESR1* selbst beschränkt.

In weiteren vier Fällen (zusammen ca. zwei Drittel) war das Amplikon möglicherweise auf die Ausdehnung des Gens *ESR1* selbst beschränkt.

Die *ESR1*-Amplifikation erstreckt sich danach in diesen Fällen über ca. 400-600 kb und ist im Verhältnis zu vielen anderen bekannten Genamplifikationen (Barlund, Tirkkonen et al. 1997;

Slomovitz, Sun et al. 2004; Heidenblad, Lindgren et al. 2008; Staaf, Jonsson et al. 2010), also in der Mehrzahl der Fälle, eher von geringer Ausdehnung. Ein weiteres auffälliges Ergebnis ist der Befund, daß das Amplikon in 22 der 24 Proben auf der 3'-Seite direkt hinter der *ESRI*-Sequenz abbricht. Dies ist auch in fünf derjenigen Karzinome der Fall, in denen der amplifizierte Bereich auf der 5'-Seite deutlich über *ESRI* hinausgeht (siehe **Abbildung 24**)

Mit der Sonde bzgl. des Klons RP3-443C4, welcher im 5'-Bereich von *ESRI* einen ca. 16 kb großen Bereich enthält, konnte bei der Auswertung in einigen Fällen keine Amplifikation nachgewiesen werden. 16 kb DNS-Sequenz ergeben allerdings möglicherweise nicht genügend Material, um unter den gewebespezifisch immer unterschiedlich günstigen Hybridisierungsbedingungen stets ein zuverlässig erkennbares FISH-Signal zu erzeugen.

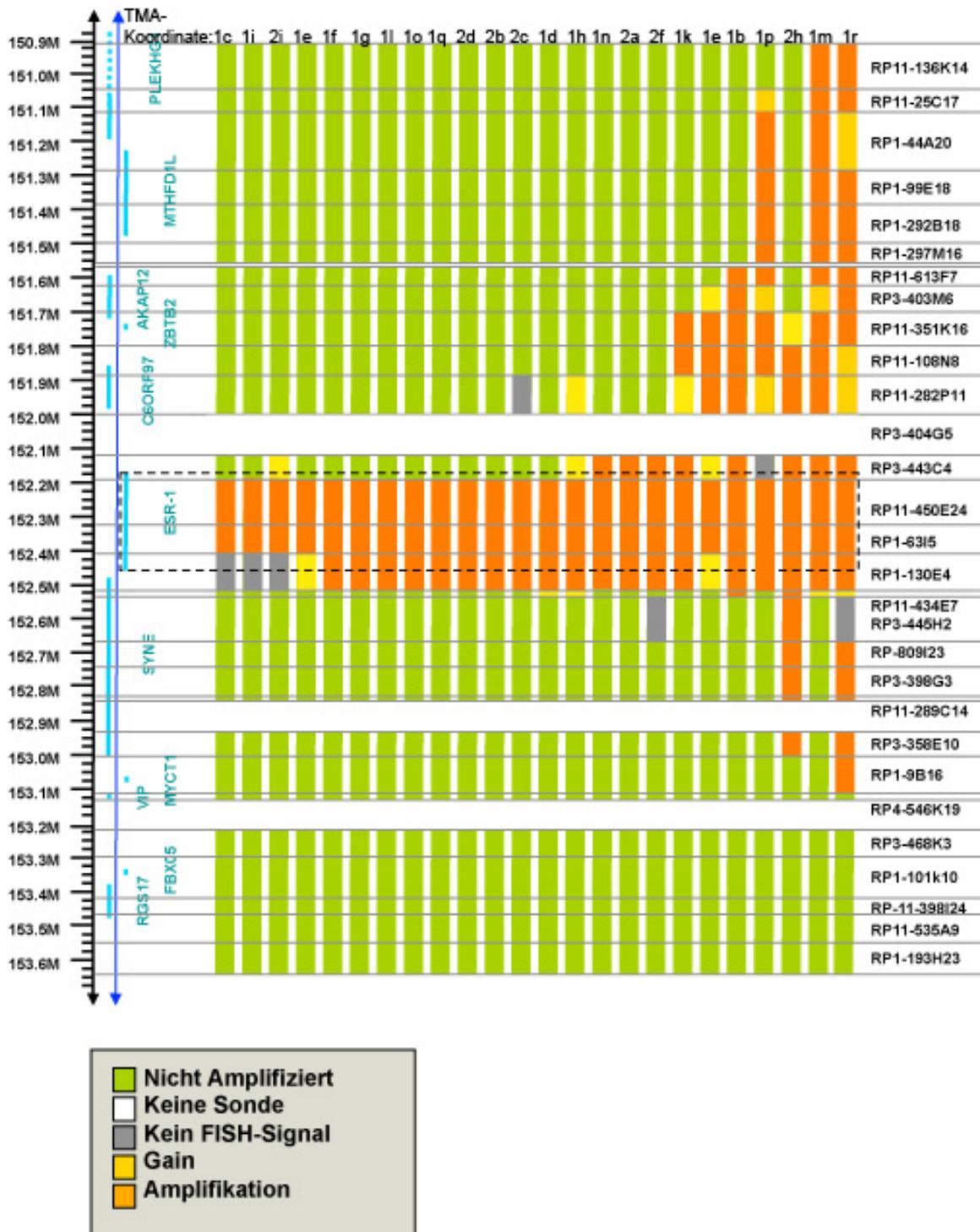
Daher ist davon auszugehen, daß dieser Bereich wahrscheinlich ebenso wie der übrige Teil des Gens *ESRI* amplifiziert ist, die Kopiezahlvermehrung hier jedoch aufgrund der geringen Größe des amplifizierten Bereichs nicht in jedem Falle nachweisbar ist (siehe dazu auch Kapitel 4.4.1).

Die gemäß der Gewebselektion (Kapitel 2.1.1.3) zugrunde gelegten FISH-Analyse als nicht *ESRI*-amplifiziert eingestuften Kontrollgewebe zeigten ausnahmslos normale *ESRI*-Kopiezahlen (n = 2).

Das Ergebnis der FISH-Kartierung des *ESRI*-Amplikons ist in **Abbildung 24** graphisch dargestellt. Die Sequenz-Bereiche, die in der FISH-Analyse mit den verschiedenen Sonden entsprechend der jeweiligen pBAC-Klone Kopiezahl erhöhungen gezeigt haben, sind entsprechend farblich markiert (siehe Legende der **Abbildung 24**).

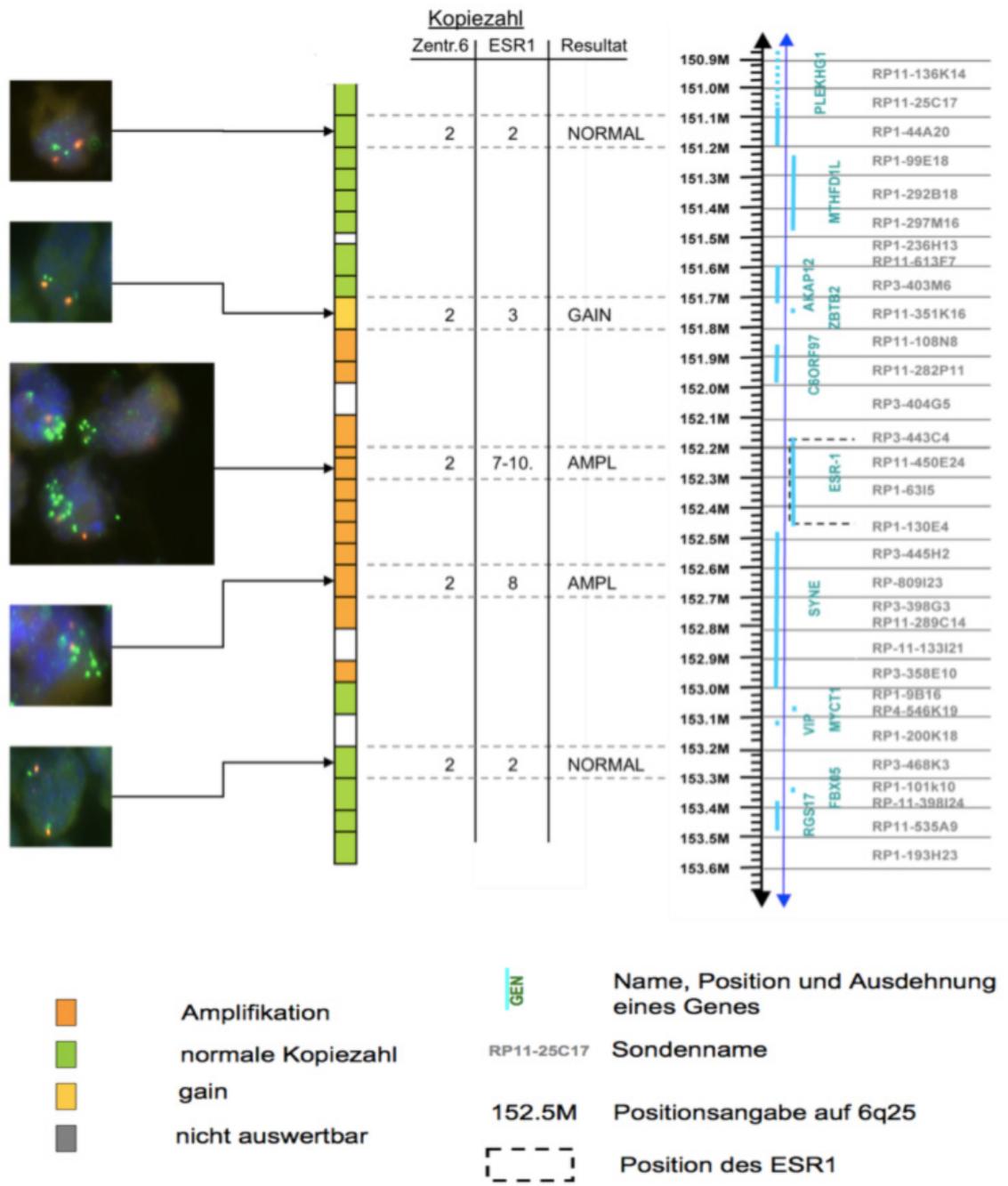
RP11-450E24 in der Version „Cancer 1G3“, welcher in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (siehe Kapitel 2.5), umfaßt recht genau den Bereich einer Kombination aus der kürzeren Version von Klon RP11-450E24 und dem Klon RP3-443C4. Der Bereich entsprechend Klon RP11-450E24 ist in der Grafik für die kurze Version des Klons dargestellt, da in der direkt angrenzenden 3'-Region dieses Klons mit dem separatem Klon (RP3-443C4) kartiert werden konnte.

Fotografische Darstellungen von FISH-Signalen, der bei der Kartierung eingesetzten Sonden, sind als Beispiele entsprechend einer Amplifikation, einem „gain“ und normaler Kopiezahlen repräsentativ anhand eines der Tumore des TMAs in **Abbildung 25** gezeigt.



**Abbildung 24** Größe und Position der *ESRI*-Amplikons in den 24 kartierten Brusttumorenproben.

Die genomische Position ist als Entfernung vom Telomer des p-Arms des Chromosoms 6 dargestellt (entsprechend der Annotierung des National Center for Biotechnology Information (NCBI) Mapview build 3.6). Die Lage der Gene ist in blau angegeben. Die 24 senkrechten farbigen Streifen zeigen die FISH-Ergebnisse für die 24 Brusttumorenproben mit den entsprechend der rechts in schwarzer Schrift angegebenen pBAC-Klone verwendeten FISH-Sonden. Grüne Bereiche entsprechen nicht erhöhter, gelbe geringgradig erhöhter („gain“) und orange amplifizierter Kopiezahl. Graue Bereiche zeigt eine nicht auswertbare FISH an. In den Bereichen der weißen Lücken stand der entsprechende Klon nicht zur Verfügung. Die Farblegende ist grau unterlegt. Abbildung in Zusammenarbeit mit M. Wendland.

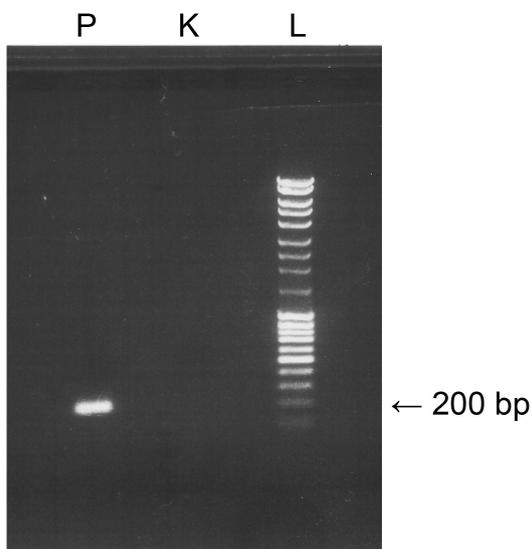


**Abbildung 25** Exemplarische Darstellung der Kartierung des Tumors entsprechend Koordinate 2h des „*ESR1*-Amplifikations-Kartierungs-TMA“ mit fotografischen Abbildungen, welche die jeweilige Analyse im Mikroskop beispielhaft wiedergeben. Abbildung in Zusammenarbeit mit M. Wendland.

In **Abbildung 6**, **Abbildung 12** und **Abbildung 20** sind zusätzlich repräsentative Fotos von *ESR1*-amplifizierten Brusttumoren und in **Abbildung 20** auch solche ohne einen Zugewinn der Kopiezahl abgebildet.

### 3.1.4 Qualitative PCR zur Überprüfung der verwendeten pBAC-Human-DNS

Die Analyse des PCR-Produkts der qualitativen PCR zur Überprüfung des für die Herstellung der *ESRI*-FISH-Sonde verwendeten pBAC-*E. coli*-Klons RP11-450E24 (Version „Cancer 1G3“) mit der Agarose-Gelelektrophorese ergab den Nachweis für ein PCR-Produkt in der zu erwartenden Länge von 196 pb (ca. 200 bp). Der Kontrollansatz zeigte kein Amplifikat. Das Ergebnis ist in Form einer Fotografie des mit UV-Licht bestrahlten Agarosegels in **Abbildung 26** dargestellt.



**Abbildung 26** Foto des Gelelektrophoresegels zur Kontrolle des PCR-Produkts der PCR zur Überprüfung der pBAC-DNS des Klons RP11-450 E24.

Bei 200 bp zeigt sich beim PCR-Produkt der pBAC-DNS-Probe (Spur P) eine entsprechende Bande. Der Kontrollansatz (Spur K) zeigt kein PCR-Produkt. Spur L zeigt den aufgetrennten DNS-Längenstandard. Eigene Abbildung.

### 3.1.5 Validierung der *ESR1*-Amplifikation mit qRT-PCR

#### 3.1.5.1 qRT-PCR mit Geweben aus dem „Amplifikations-Test-TMA“

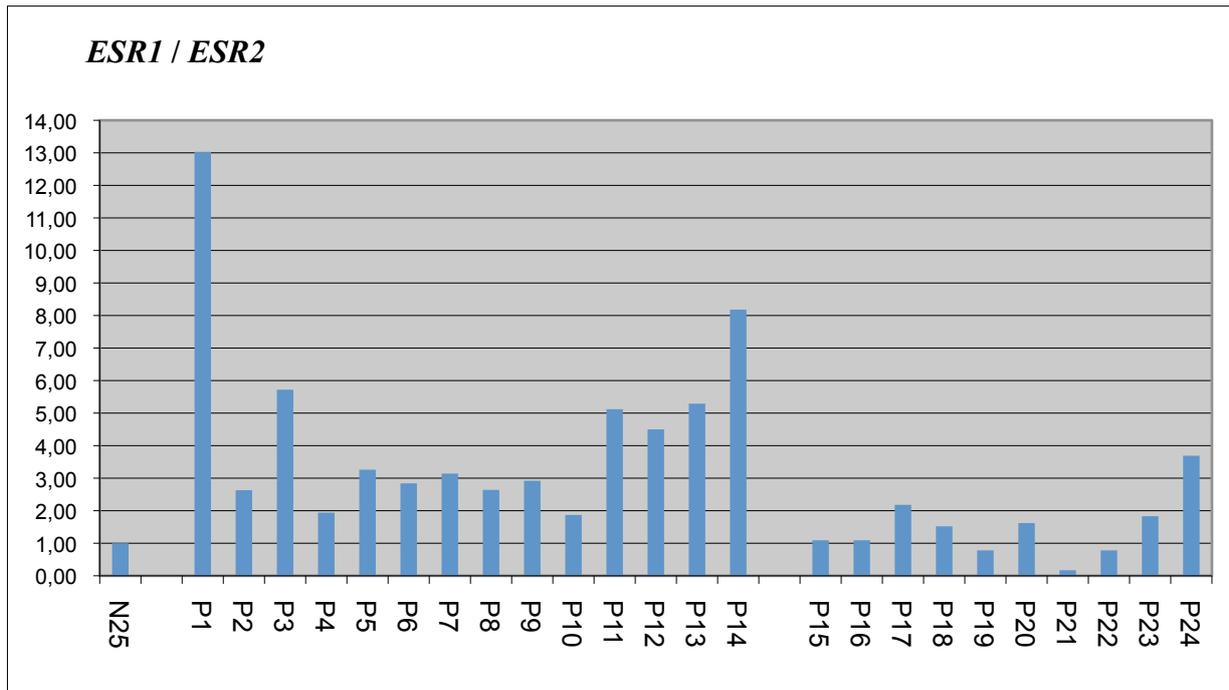
Um die *ESR1*-Amplifikation methodenübergreifend, stichprobenartig aber prinzipiell und DNS-spezifisch zu verifizieren, wurden zunächst 14 verfügbare Mammakarzinome aus dem „Amplifikations-Test-TMA“, welche gemäß FISH-Analyse eine *ESR1*-Amplifikation aufwiesen, sowie zehn Karzinome ohne erkennbare *ESR1*-Amplifikation mit der qRT-PCR-Methode untersucht (siehe auch Kapitel 2.1.1.4).

Dieser Versuchsansatz wurde mit *ESR1* als Zielgen und den beiden Genen *ESR2* und *SOD2* als Referenz durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen dieses Ansatzes wurden im Triplikate angesetzt und für jedes Triplikate ein durchschnittliche relative Ratio von Zielgen zu Referenzgen errechnet. Die Normalisierung erfolgte über eine käufliche Normalstandard-DNS (siehe Kapitel 2.7.2.2). Die Kontrollansätze zeigten kein signifikantes Signal oberhalb des Hintergrundrauschens (siehe Kapitel 1.4.4 bzw. **Abbildung 15**).

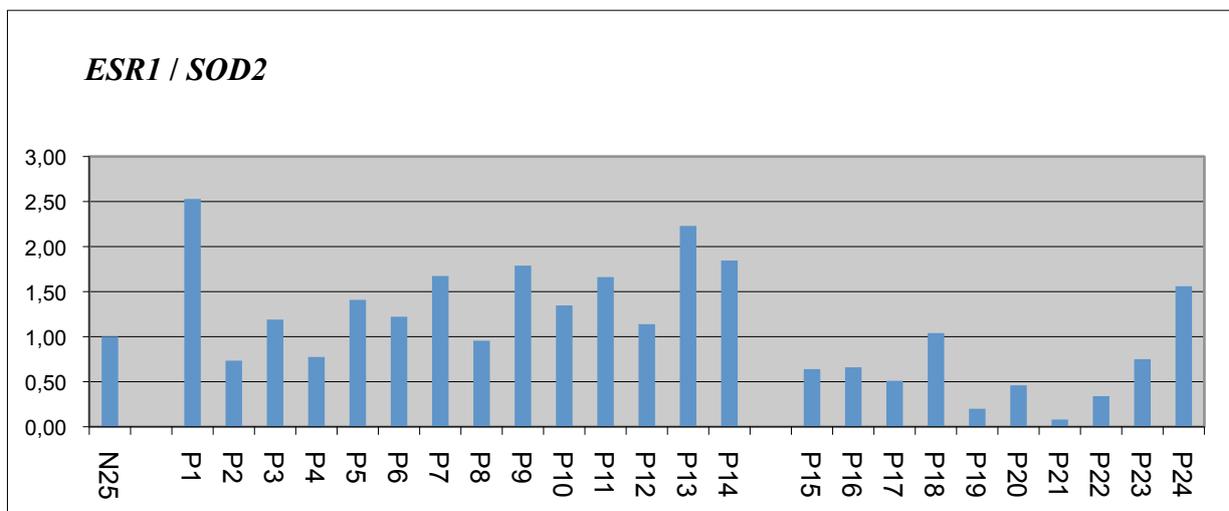
In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse aufgeführt und in **Abbildung 27** bzw. **Abbildung 28** im Balkendiagramm graphisch dargestellt.

Proben der qRT-PCR	Koordinate auf dem „ESRI-Amplifikations-Karterung-TMA“	Ratio <i>ESR1 / ESR2</i> (normalisiert)	Ratio <i>ESR1 / SOD2</i> (normalisiert)	<i>ESR1-5'</i> -Amplifikationsstatus	<i>ESR1-3'</i> -Amplifikationsstatus
N25	-	1,00	1,00	-	-
P1	1b	13,03	2,53	amplifiziert	nicht amplifiziert
P2	1c	2,63	0,73	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P3	1f	5,72	1,19	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P4	1h	1,94	0,77	„gain“	nicht amplifiziert
P5	1k	3,26	1,41	„gain“ / amplifiziert	nicht amplifiziert
P6	1l	2,84	1,22	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P7	1n	3,14	1,67	amplifiziert	nicht amplifiziert
P8	1o	2,64	0,95	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P9	1p	2,92	1,79	amplifiziert	nicht amplifiziert
P10	2a	1,87	1,35	mögl. amplifiziert	nicht amplifiziert
P11	2b	5,12	1,66	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P12	2d	4,5	1,14	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
P13	2f	5,29	2,23	mögl. amplifiziert	nicht amplifiziert
P14	2h	8,18	1,85	amplifiziert	amplifiziert
P15	2k	1,09	0,64	-	-
P16	2l	1,09	0,66	-	-
P17	2m	2,18	0,51	-	-
P18	2n	1,52	1,04	-	-
P19	2o	0,78	0,2	-	-
P20	2p	1,62	0,46	-	-
P21	2q	0,17	0,08	-	-
P22	2r	0,78	0,34	-	-
P23	3a	1,83	0,75	-	-
P24	3b	3,69	1,56	-	-
Mittelwert P1-P14		4,51	1,46	-	-
Mittelwert P15-P24		1,48	0,62	-	-
Median P1-P14		3,20	1,38	-	-
Median P15-P24		1,31	0,58	-	-
U-Test (p-Wert, zweiseitig) P1-P14 / P15-P24		0,0001	0,0003	-	-

**Tabelle 6** Ratios des qRT-PCR-Experiments mit den Proben aus dem „Amplifikations-Test-TMA“ sowie *ESR2* und *SOD2* als Referenz



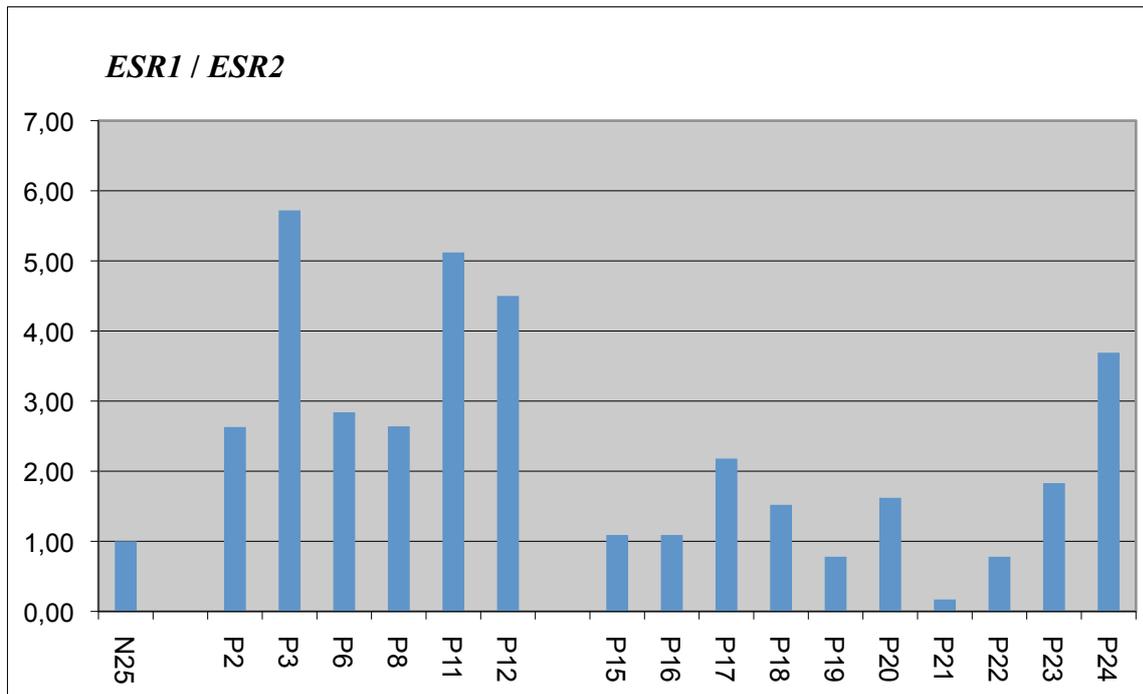
**Abbildung 27** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. *ESR2* als Referenz. *ESR1*-amplifizierte Proben: P1 - P14. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: P15 – P24. DNS-Normalstandard: N25. Eigene Abbildung.



**Abbildung 28** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. *SOD2* als Referenz. *ESR1*-amplifizierte Proben: P1 - P14. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: P15 – P24. DNS-Normalstandard: N25. Eigene Abbildung.

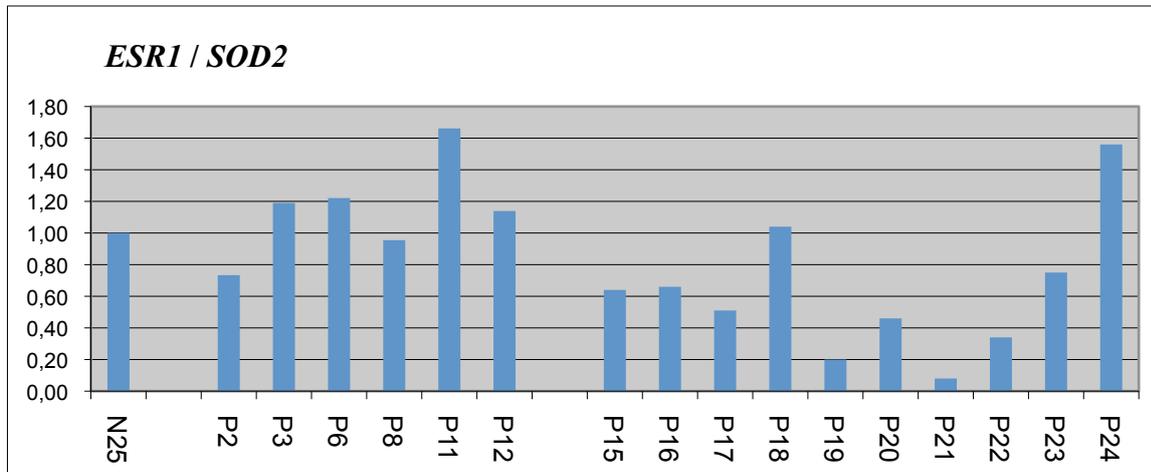
Die mit Hilfe der FISH-Methode gebildeten Gruppen der *ESR1*-amplifizierten Proben und der nicht *ESR1*-amplifizierten Proben unterscheiden sich sowohl bei *ESR2* als auch bei *SOD2* als Referenzgen signifikant voneinander ( $p = 0,00002$  für *ESR2* und  $p = 0,0001$  für *SOD2* als Referenz, entsprechend zweiseitigem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Withney) (siehe auch Kapitel 2.7.2.3).

Nach Ausschluß der Gewebe (P1, P4, P5, P7, P9, P10, P13 und P14) deren *ESR1*-Amplifikation entweder auf der 3'- oder der 5'-Seite nach den Daten der Kartierung nachweisbar oder möglicherweise über *ESR1* hinausgeht, oder deren FISH-Analyse mindestens auf einer Seite nicht auswertbar waren (siehe **Tabelle 6**: 3'- bzw. 5'-Amplifikationsstatus), wurde der statistische Unterschied beider Gruppen erneut berechnet. Die Berechnung zeigt, daß ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestehen bleibt. Der p-Wert des zweiseitigen U-Tests für die qPCR mit *ESR2* als Referenz beträgt nun 0,0017 und für *SOD2* als Referenz 0,015. Die entsprechenden Ergebnisse sind als Balkendiagramm der Ratios in **Abbildung 29** und **Abbildung 30** dargestellt.



**Abbildung 29** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. *ESR2* als Referenz.

Die Proben, deren *ESR1*-Amplifikation sich nicht eindeutig auf *ESR1* selbst beschränkt, wurden hier von der Auswertung ausgeschlossen. *ESR1*-amplifizierte Proben: P2 – P12. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: P15 – P24. DNS-Normalstandard: N25. Eigene Abbildung.



**Abbildung 30** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios bzgl. *SOD2* als Referenz.

Die Proben, deren *ESR1*-Amplifikation sich nicht eindeutig auf *ESR1* selbst beschränkt, wurden hier von der Auswertung ausgeschlossen. *ESR1*-amplifizierte Proben: P2 – P12. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: P15 – P24. DNS-Normalstandard: N25. Eigene Abbildung.

### 3.1.5.2 qRT-PCR mit Geweben aus einem alternativen Kollektiv

Mit einem alternativen Kollektiv von zehn weiteren Mammakarzinomen, welche gemäß FISH-Analyse eine *ESR1*-Amplifikation trugen und zehn weiteren entsprechenden Kontrollgeweben wurde eine neue qRT-PCR durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.1.1.4 und 4.4.2).

Um sicherzustellen, daß hierbei nur Teile der Gewebeproben mit einer möglichst hohen Dichte an Tumorzellen zur Analyse kamen, wurde die Lasermikrodissektion eingesetzt.

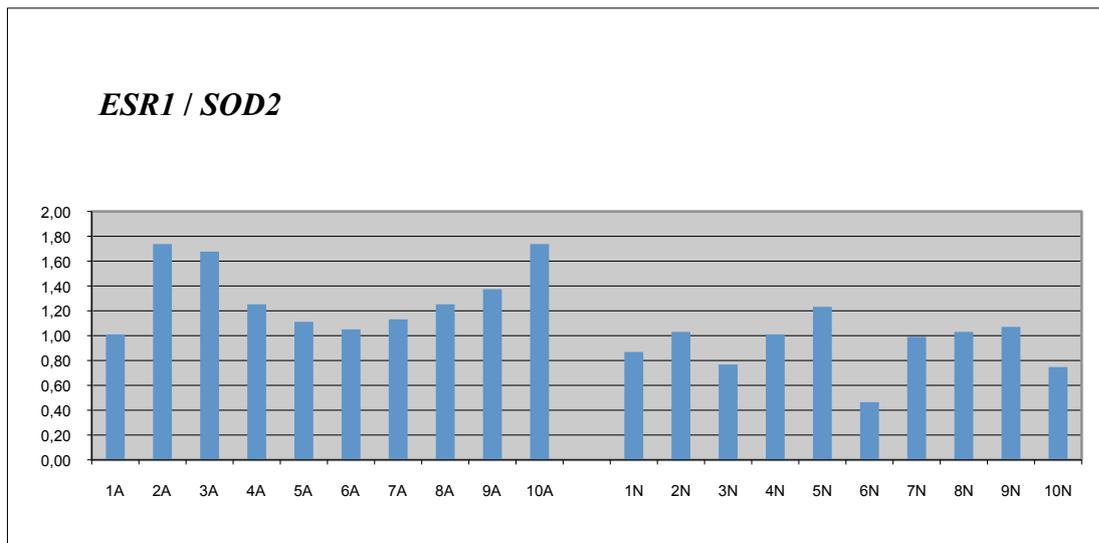
Neben *SOD2* wurde in diesem Ansatz auch *ASXL2* ausgewählt.

Auch hier zeigte sich entsprechend dem zweiseitigen U-Test ein signifikanter Unterschied in der Ratio sowohl bei *ESR1* zu *SOD2* (Median: 1,25 bzw. Mittelwert 1,33) als auch bei *ESR1* zu *ASXL2* (Median: 2,00 bzw. Mittelwert 1,99) zwischen den gemäß FISH-Untersuchung als *ESR1*-amplifiziert und den als nicht amplifiziert eingestuft Mammakarzinomen (Median auf den Wert 1 gesetzt) ( $p = 0,0007$  für *SOD2* und  $p = 0,003$  für *ASXL2* als Referenz) (**Tabelle 7**, **Abbildung 31** und **Abbildung 32**).

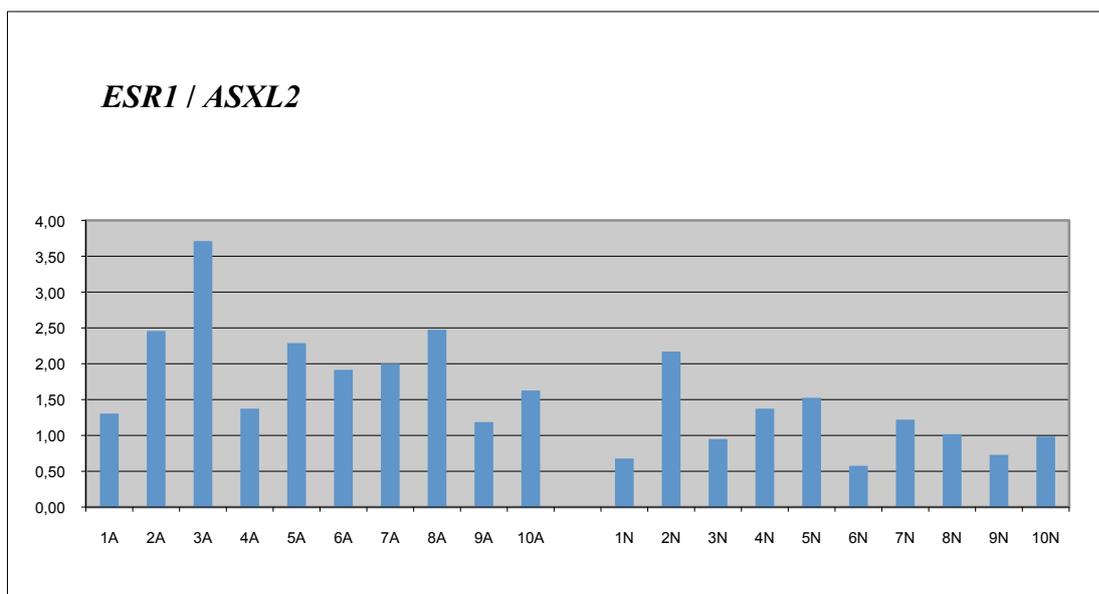
Bezüglich des Referenzgens *ASXL2* erreichen vier bis fünf der zehn gemäß FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierten Proben eine Ratio  $\geq 2,0$ . Dies entspricht ca. 40 - 50 %. Wiederum hochgerechnet auf eine Amplifikationsrate gemäß FISH-Analyse der vorliegenden Arbeit von 20,6 %, ergibt sich hypothetisch eine durch qPCR bestätigte Amplifikationsrate von ca. 8 - 10 % einer entsprechenden Gesamtheit an Mammatumoren.

Probe	Ratio (Median N = 1) <i>ESRI / SOD2</i>	Ratio (Mittelw. N = 1) <i>ESRI / SOD2</i>	Ratio (Median N = 1) <i>ESRI / ASXL2</i>	Ratio (Mittelw. N = 1) <i>ESRI / ASXL2</i>	<i>ESRI-5'</i> - Amplifikationsstatus	<i>ESRI-3'</i> - Amplifikationsstatus
1A	1,01	1,10	1,31	1,16	nicht amplifiziert	n.a.
2A	1,74	1,89	2,46	2,19	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
3A	1,68	1,82	3,71	3,31	n.a.	n.a.
4A	1,25	1,36	1,37	1,22	n.a.	n.a.
5A	1,11	1,21	2,29	2,04	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
6A	1,05	1,14	1,92	1,71	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
7A	1,13	1,23	2,00	1,78	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
8A	1,25	1,36	2,47	2,21	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
9A	1,37	1,49	1,19	1,06	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
10A	1,74	1,89	1,63	1,45	nicht amplifiziert	nicht amplifiziert
1N	0,87	0,94	0,68	0,60	-	-
2N	1,03	1,12	2,17	1,93	-	-
3N	0,77	0,83	0,95	0,85	-	-
4N	1,01	1,10	1,37	1,22	-	-
5N	1,23	1,34	1,53	1,36	-	-
6N	0,46	0,50	0,58	0,51	-	-
7N	0,99	1,07	1,22	1,09	-	-
8N	1,03	1,12	1,02	0,91	-	-
9N	1,07	1,16	0,73	0,65	-	-
10N	0,75	0,81	0,98	0,88	-	-
Median (A)	1,25	1,36	2,00	1,74	-	-
Mittelw. (A)	1,34	1,45	1,99	1,81	-	-
Median (N)	1,00	1,09	1,00	0,89	-	-
Mittelw. (N)	0,92	1,00	1,12	1,00	-	-
					-	-
U-Test (zweiseitig) p-Wert	0,0007	0,001	0,003	0,003	-	-

**Tabelle 7** Ratios des qRT-PCR-Experiments mit den Proben des alternativen Gewebekollektivs sowie *SOD2* und *ASXL2* als Referenz



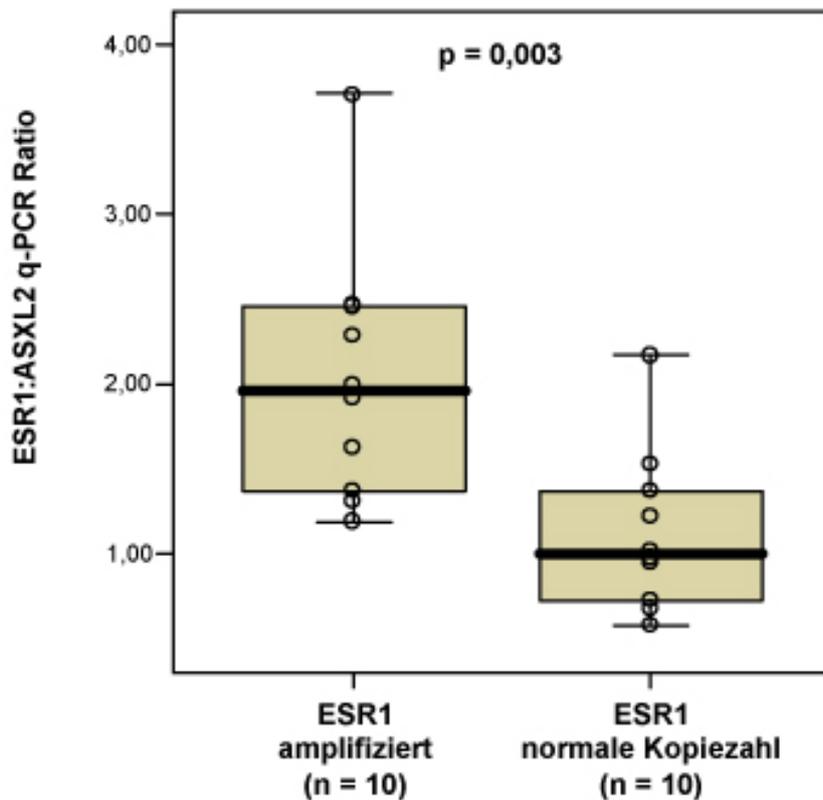
**Abbildung 31** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. *SOD2* als Referenz *ESRI*-amplifizierte Proben: 1A – 10A. Nicht *ESRI*-amplifizierte Proben: 1N – 10N (Median N = 1). Eigene Abbildung.



**Abbildung 32** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. *ASXL2* als Referenz *ESRI*-amplifizierte Proben: 1A – 10A. Nicht *ESRI*-amplifizierte Proben: 1N – 10N (Median N = 1). Eigene Abbildung.

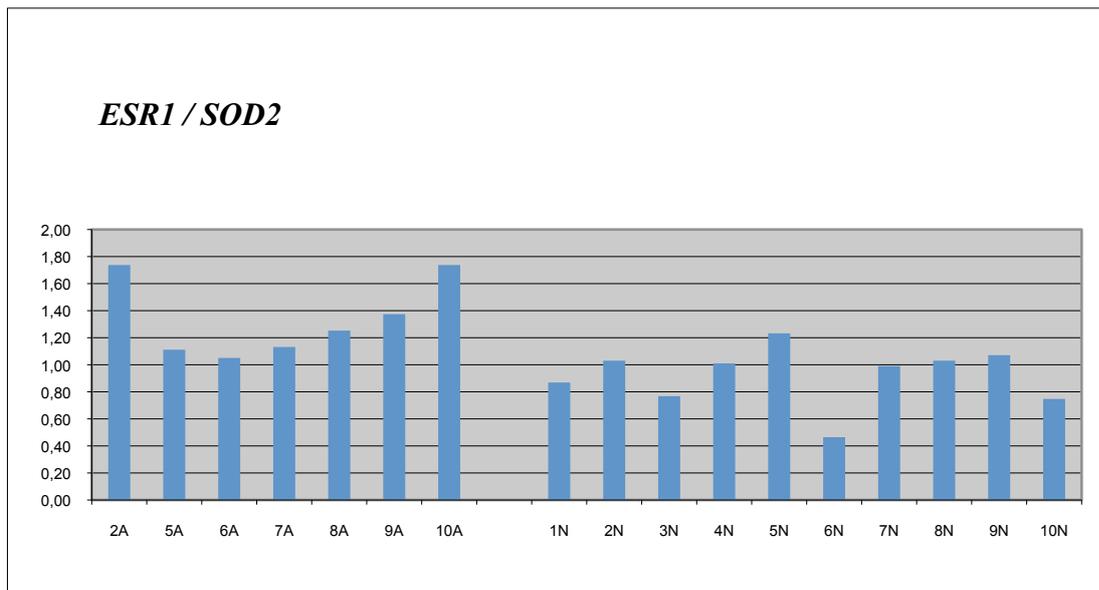
Der Box-Plot für die Ratios der *ESRI*-qRT-PCR mit dem Referenzgen *ASXL2* ist in

**Abbildung 33** dargestellt.

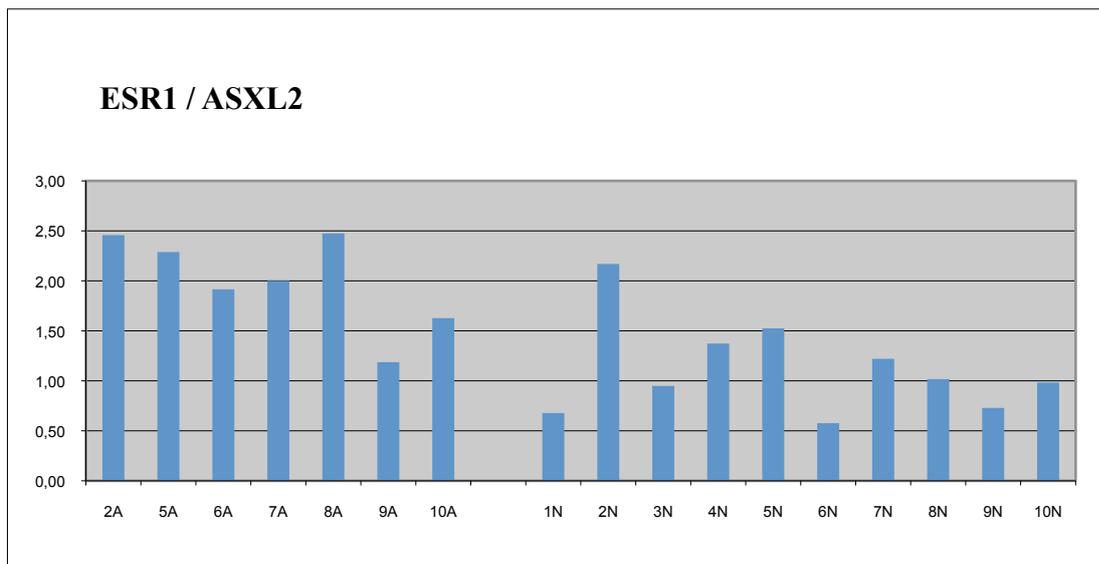


**Abbildung 33** Box-Plot für die Ratios der *ESR1*-qPCR bzgl. des Referenzgens *ASXL2* (Median N = 1). Eigene Abbildung in der Zusammenarbeit mit R. Simon und O. Hellwinkel .

Auch hier wurde nach Ausschluß der Gewebe (1A, 3A und 4A) deren *ESR1*-Amplifikation mindestens auf einer Seite über *ESR1* hinausgeht, oder deren FISH-Analyse mindestens auf einer Seite (3' oder 5') nicht auswertbar war (siehe **Tabelle 7**), der statistische Unterschied beider Gruppen erneut berechnet. Der diesbezügliche p-Wert des zweiseitigen U-Tests (nach Wilcoxon, Mann und Withney) für die qPCR mit *SOD2* als Referenz beträgt nun 0,001 (Median und Mittelwert) und für *ASXL2* als Referenz 0,005 (Median und Mittelwert), berechnet sowohl für den auf den Wert 1 gesetzten Median als auch den auf 1 gesetzten Mittelwert der gemäß FISH-Analyse nicht amplifizierten Proben. Die entsprechenden Ergebnisse sind als Balkendiagramm der Ratios (für den auf 1 gesetzten Median der Ratios der gemäß FISH-Analyse nicht *ESR1*-amplifizierten Gewebeproben) in **Abbildung 34** und **Abbildung 35** dargestellt.



**Abbildung 34** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. *SOD2* als Referenz. Die Proben, deren *ESR1*-Amplifikation sich nicht eindeutig auf *ESR1* selbst beschränkt, wurden hier von der Auswertung ausgeschlossen. *ESR1*-amplifizierte Proben: 2A – 10A. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: 1N – 10N (Median N = 1). Eigene Abbildung.



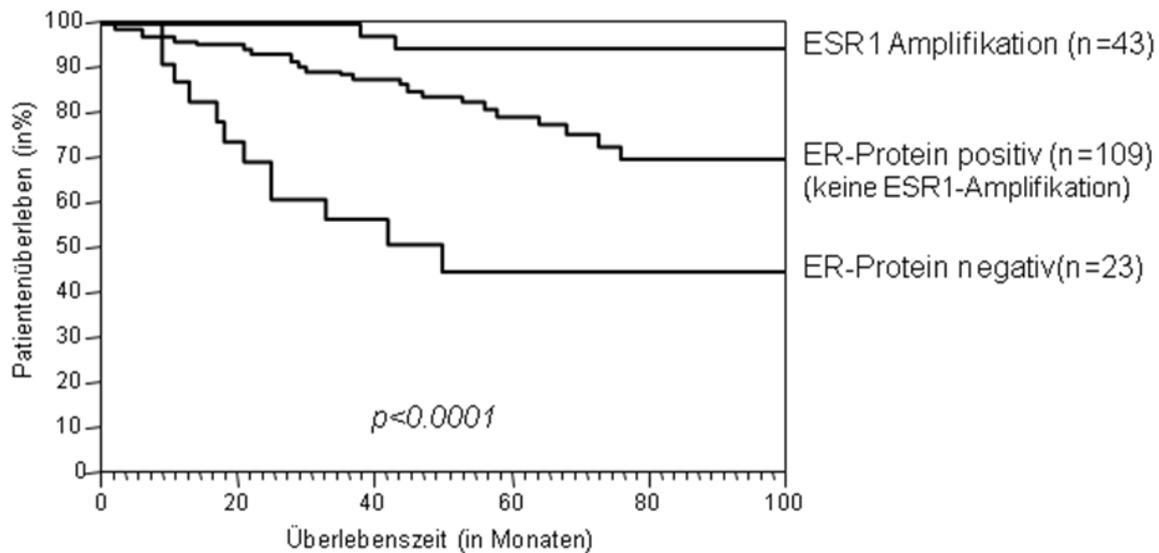
**Abbildung 35** Balkendiagramm der qRT-PCR-Ratios des alternativen Kollektivs bzgl. *ASXL2* als Referenz. Die Proben, deren *ESR1*-Amplifikation sich nicht eindeutig auf *ESR1* selbst beschränkt, wurden hier von der Auswertung ausgeschlossen. *ESR1*-amplifizierte Proben: 2A – 10A. Nicht *ESR1*-amplifizierte Proben: 1N – 10N (Median N = 1). Eigene Abbildung.

### 3.1.6 Prädiktive Relevanz der *ESR1*-Kopiezahlvermehrungen

Um eine mögliche klinische Relevanz der *ESR1*-Amplifikation zu ermitteln, wurde innerhalb der auf dem Prognose- und Progressions-TMA repräsentierten Patientinnen-Kollektiv eine Untergruppe von 261 Patientinnen identifiziert, welche nur mit einer adjuvanten Anti-ER-Monotherapie mit Tamoxifen behandelt wurde (zur Bedeutung von Tamoxifen: siehe Kapitel 1.2.2). Um das spezifische Ansprechen des Tumors auf diese Anti-ER-Therapie bzgl. des Amplifikationsstatus auch im Vergleich zum ER-Status (positiv / negativ) zu analysieren, wurden die Patientinnen zunächst in drei Gruppen unterteilt:

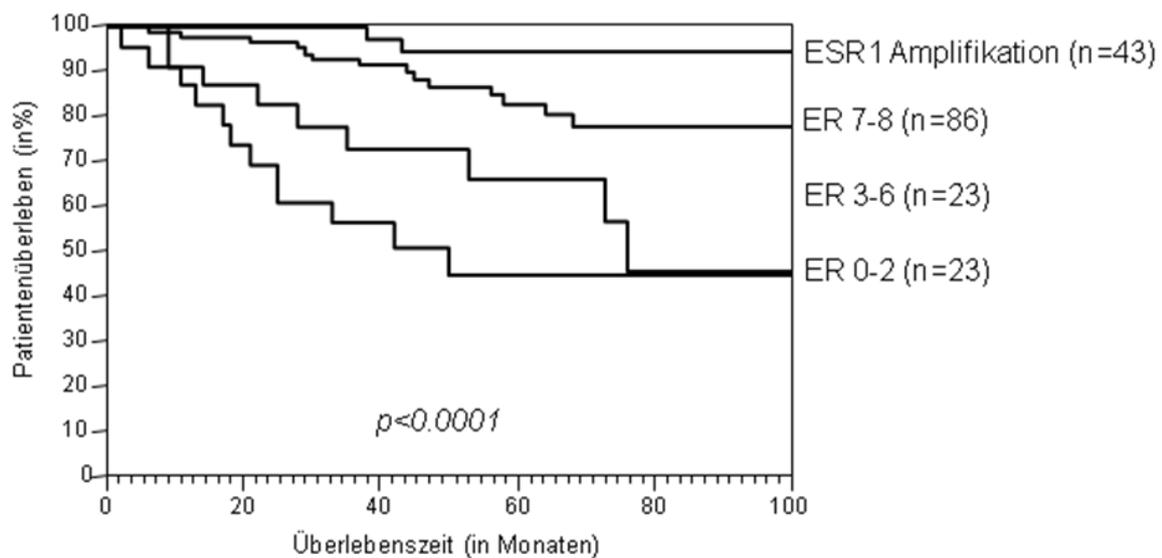
- I. ER-IHC negativ (0-1 nach Allred)
- II. ER-IHC positiv (2-8 nach Allred), aber keine *ESR1*-Amplifikation
- III. *ESR1*-Amplifikation

In Übereinstimmung mit den bekannten klinischen Erfahrungen war die Vorhersage für das Überleben der Patientinnen mit IHC-negativen Tumoren am schlechtesten. Bemerkenswerterweise zeigte sich aber, daß die Patientinnengruppe mit *ESR1*-Amplifikationen eine signifikant bessere Prognose bzw. Prädiktion hatte, als die Patientinnengruppe, die zwar ER-IHC positiv war, aber keine *ESR1*-Amplifikation zeigte ( $p = 0,0233$ ). Die Überlebenskurven für *ESR1*-amplifizierte Fälle und für ER-IHC-positiv Fälle ohne *ESR1*-Amplifikation sind in **Abbildung 36** dargestellt. Die bessere Prognose bzw. Prädiktion bestätigte sich zumindest tendenziell auch für Tumore mit *ESR1*-Amplifikationen gegenüber den Tumoren mit den höchsten ER-Expressionsniveaus von 7 - 8 nach Allred ( $p = 0,0889$ ). Die entsprechenden Überlebenskurven für *ESR1*-amplifizierte Fälle gegenüber den nach ER-Expressionsniveau aufgeteilten, nicht *ESR1*-amplifizierten Fällen ist in **Abbildung 37** dargestellt. Die Vorhersage für das Überleben der Patientinnen war außerdem abhängig von der absoluten *ESR1*-Kopiezahlvermehrung (**Abbildung 38**).



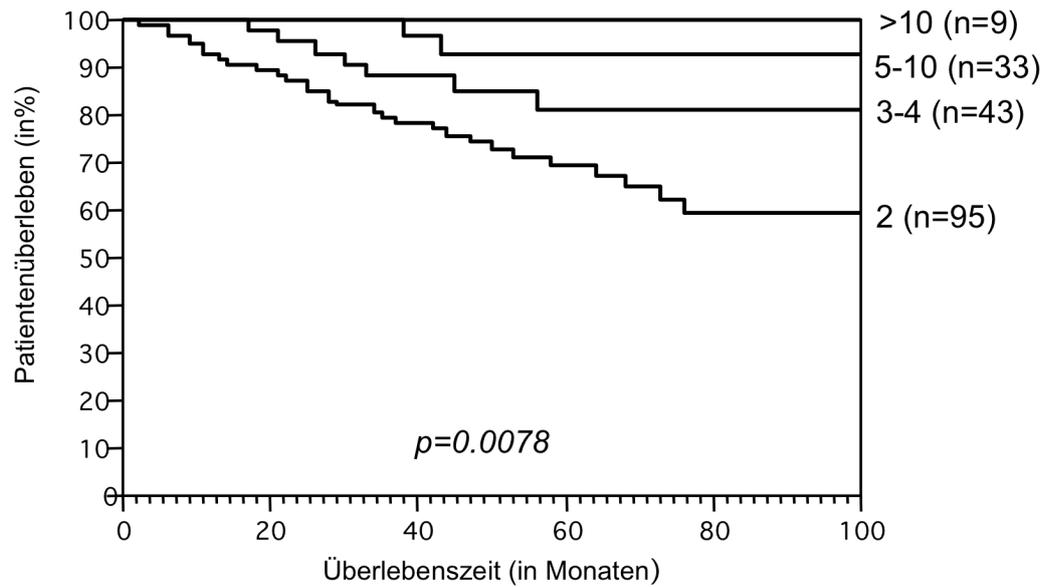
**Abbildung 36** Einfluß des *ESR1*-Amplifikationsstatus und des ER-Expressionsstatus auf das Überleben bei Patientinnen mit Tamoxifen-Monotherapie.

Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und P. Stahl (Holst, Stahl et al. 2007).



**Abbildung 37** Einfluß der *ESR1*-Amplifikation auf das Patientinnenüberleben im Vergleich zu verschiedenen ER-Expressionsniveaus.

Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und P. Stahl (Holst, Stahl et al. 2007).



**Abbildung 38** Einfluß der *ESRI*-Kopiezahl auf das Patientinnenüberleben.  
Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und P. Stahl (Holst, Stahl et al. 2007).

Die *ESRI*-Amplifikation zeigte sich in einer multivariaten Analyse (Cox-Regression) als unabhängiger Prognosemarker (siehe **Tabelle 8**).

Parameter		p-Wert
pT-Stadium	pT1 - 4	0,3867
Tumorgrad	G1 - 3	0,1568
Nodalstadium	pN0 - pN2	< 0,0001
ER-Expressionsstatus	negativ bzw. positiv (gemäß Allred)	0,0003
<i>ESR1</i> -Amplifikationsstatus	Normal versus Amplifikation bzw. „gain“	0,0080

**Tabelle 8** Einfluß verschiedener potentieller prognostischer Faktoren auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten (Cox-Regression).

### 3.1.7 Untersuchung auf das Vorkommen von *PGR*-Amplifikationen im Zusammenhang mit *ESR1*-Amplifikationen

Um den Zusammenhang der *ESR1*-Amplifikation mit möglicherweise bisher unentdeckt gebliebenen Amplifikationen des Progesteronrezeptor-Gens zu untersuchen, wurde der „Amplifikations-Test-TMA“ auch auf das Vorkommen von *PGR*-Amplifikationen hin untersucht.

Außer einem geringgradigen Kopiezahlzugewinn („gain“) konnten keine weiteren Kopiezahlzugewinne festgestellt werden.

## 3.2 *ESR1*-Amplifikationen beim Endometriumkarzinom

### 3.2.1 ER-Expression

Die immunhistochemische Analyse der ER-Expression war bei 304 von 368 (82,6 %) Endometriumkarzinom-Geweben, die sich auf dem verwendeten Array befanden, erfolgreich. In den übrigen Gewebeproben mißlang die Auswertung der IHC aufgrund fehlenden Tumorgewebes ( $n = 25$ ; 6,8 %) oder komplett fehlender „Gewebspots“ ( $n = 39$ ; 10,6 %). 88,5 % der Tumore waren ER-positiv. Die stärkste Färbung (Grad 7 - 8 nach Allred) trat in 173 von 304 (57 %) der Proben auf und war mit dem frühen FIGO-Stadium ( $p = 0,0110$ ), einem niedrigem Grad (0,0016) und dem histologischen Grad des endometrioiden Subtyps ( $p < 0,0001$ ) assoziiert. Der Grad der ER-Expression war unabhängig von der Patientenprognose (**Abbildung 39a**). Die bekannte prognostische Bedeutung des FIGO-Stadiums ( $p < 0,0001$ , **Abbildung 39c**), des Grades ( $p = 0,0008$ , **Abbildung 39d**) und des serösen histologischen Subtyps ( $p < 0,0001$ ) konnte dagegen bestätigt werden. Eine ER-Expression wurde ebenfalls in allen (43 / 43; 100 %) analysierten endometrialen Hyperplasien festgestellt, meistens (31 / 43; 72 %) von großer Intensität (Grad 7 - 8). Eine hohe ER-Expression war signifikant mit dem endometrioiden Typ des Endometriumkarzinoms, einem geringen Tumorstatus (pT) und geringem Tumorgrad assoziiert. Beispiele der IHC sind in **Abbildung 40** dargestellt. Die gesamten Ergebnisse der IHC sind in **Tabelle 13** im Anhang zusammengefaßt.

### 3.2.2 *ESR1*-Amplifikation

Der *ESR1*-Status konnte für 176 (48 %) der 368 Endometriumkarzinome des verwendeten Arrays erfolgreich bestimmt werden. Insgesamt 192 Fälle waren nicht analysierbar, da die „Gewebspots“ entweder verloren gegangen waren ( $n = 56$ ) oder die FISH-Signale nicht eindeutig auswertbar waren. Gemäß der vorher definierten Kriterien (Ratio *ESR1* / Zentromer 6  $\geq 2,0$  bzw. die Anwesenheit von Signalclustern) zeigten sich in 40 (22,7 %) von 176 analysierbaren Gewebeproben Amplifikationen des Gens *ESR1*. Weitere zehn (5,7 %) Gewebeproben erfüllten die Kriterien eines *ESR1*-„gains“. **Abbildung 40** zeigt Beispiele amplifizierter und nicht amplifizierter Gewebeanteile. In **Abbildung 41** sind amplifizierte Tumorzellen und solche ohne erhöhte Kopiezahl in größerer Auflösung abgebildet. Die Amplifikationen waren mit meist vier bis neun Signalen von eher geringer Kopiezahl. Alle amplifizierten Fälle zeigten eine sehr enge wölkchenförmige Anordnung (Cluster) der zusätzlichen *ESR1*-Kopien. Das läßt darauf schließen, daß es sich um kurze intrachromosomale Amplifikationen handelt (HSR-Typ). „High level“-Amplifikationen ( $\geq 10$

Signale pro Tumorzelle, max. 15) wurden lediglich in 8 Fällen (20 % der amplifizierten Fälle) gefunden. Die *ESRI*-Amplifikationen und „gains“ waren mit keinem histopathologischen Parameter, wie dem histologischen Subtyp, FIGO-Status ( $p = 0,2527$ ) oder dem Grad ( $p = 0,4763$ ) assoziiert. Zur Patientenprognose ließ sich ebenfalls kein Zusammenhang feststellen (**Abbildung 39b**).

Bei 174 Tumoren gab es Ergebnisse für FISH und IHC. Eine positive ER-Proteinexpression („Allred-Score“ 3 - 8) stand signifikant mit einer *ESRI*-Amplifikation in Zusammenhang ( $p = 0,0036$ ). Eine mäßige bis starke ER-Expression („Allred-Score“ 5 - 8) wurde in 95 % der *ESRI*-amplifizierten Tumore, aber nur in 68,5 % ohne *ESRI*-Kopiezahländerungen gefunden. Die *ESRI*-Amplifikationen waren nicht nur auf Endometriumkarzinome beschränkt, sondern wurden in ähnlicher Häufigkeit auch schon in den Hyperplasien gefunden.

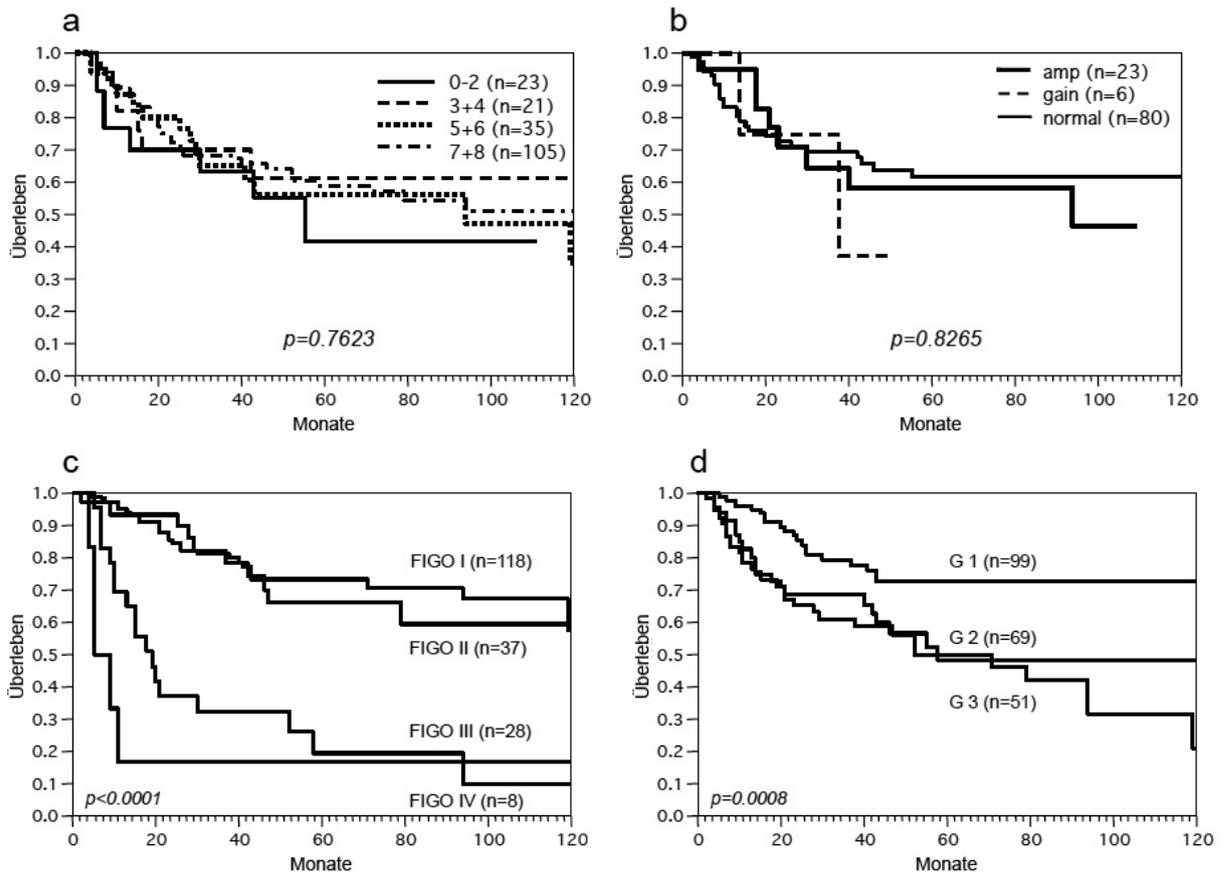
Analysen an Gewebegroßschnitten von nicht karzinomatösen endometrialen Veränderungen ergaben *ESRI*-Amplifikationen in 25,6 % der Proben, einschließlich 6 von 19 komplexen Hyperplasien mit Atypien, drei von 10 komplexen Hyperplasien ohne Atypien und 2 von 14 einfachen Hyperplasien ohne Atypien. In diesen Fällen war die *ESRI*-Amplifikation auf die epithelialen Zellen des hyperplastischen Endometriums beschränkt.

Wie bei den Krebsgeweben war die ER-Expression auch bei den Hyperplasien an die *ESRI*-Kopiezahlveränderungen gekoppelt. Hochgradige ER-Expression („Allred-Score“ 7 - 8) wurde in 10 von 11 (91 %) Hyperplasien mit *ESRI*-Amplifikation, aber nur in 21 von 32 (65 %) der Hyperplasien ohne *ESRI*-Amplifikation ( $p = 0,0816$ ) gefunden.

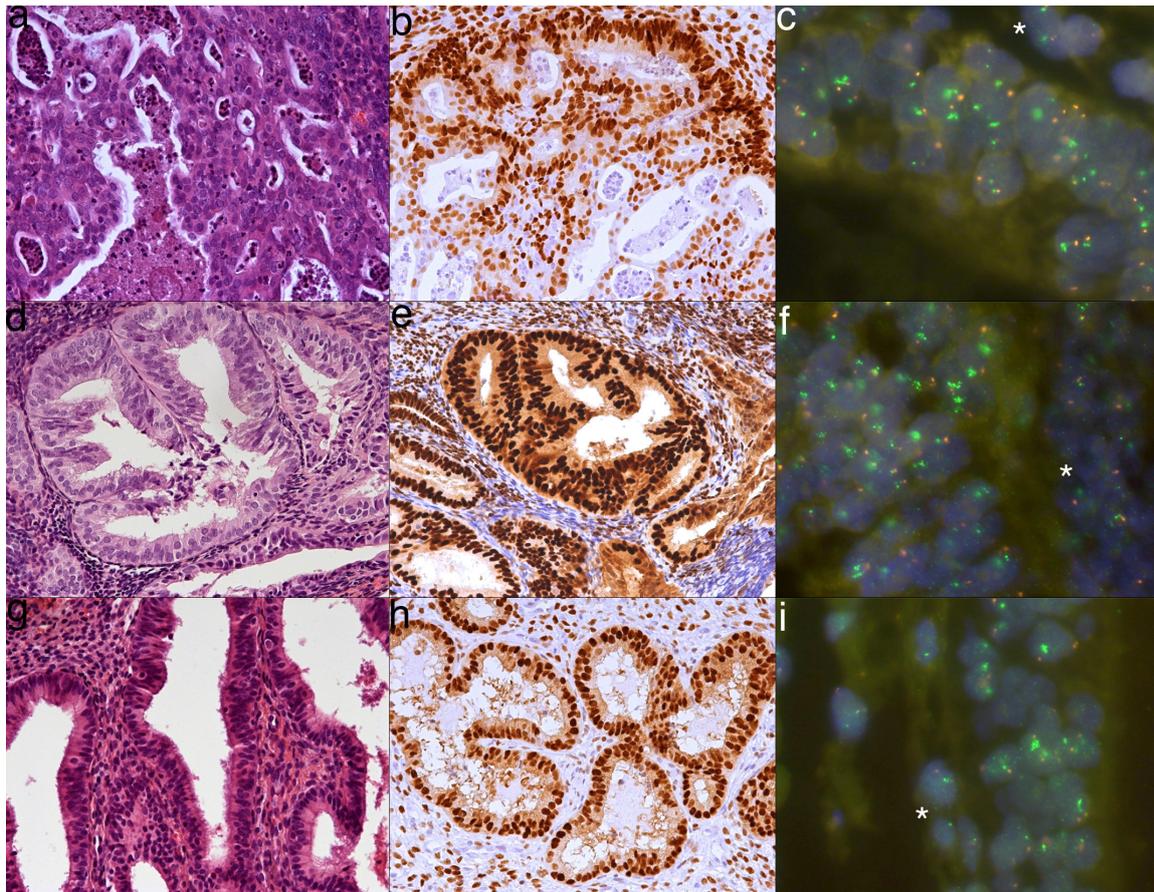
Alle FISH-Ergebnisse sind im Anhang in **Tabelle 14** zusammengefaßt. Die Assoziation zwischen der *ESRI*-Kopiezahl und dem Grad der ER-Expression in Endometriumkarzinomen und Hyperplasien ist in **Tabelle 9** gezeigt. Beispiele von *ESRI*-amplifizierten Endometriumkarzinomen und Hyperplasien sind in **Abbildung 40** dargestellt.

<i>ESR1</i> -FISH-Ergebnis		ER-IHC-Ergebnis („Allred-Score“)			
	n	0 - 2 (%)	3 - 4 (%)	5 - 6 (%)	7 - 8 (%)
<b>Tumore</b>					
nicht amplifiziert	124	16,1	15,3	16,1	52,4
„gain“	10	10,0	10,0	40,0	40,0
Amplifikation	40	5	0	27,5	67,5
<b>Hyperplasien</b>					
nicht amplifiziert	32	0	3,1	34,4	62,5
„gain“	0	0	0	0	0
Amplifikation	11	0	0	9,1	91,0

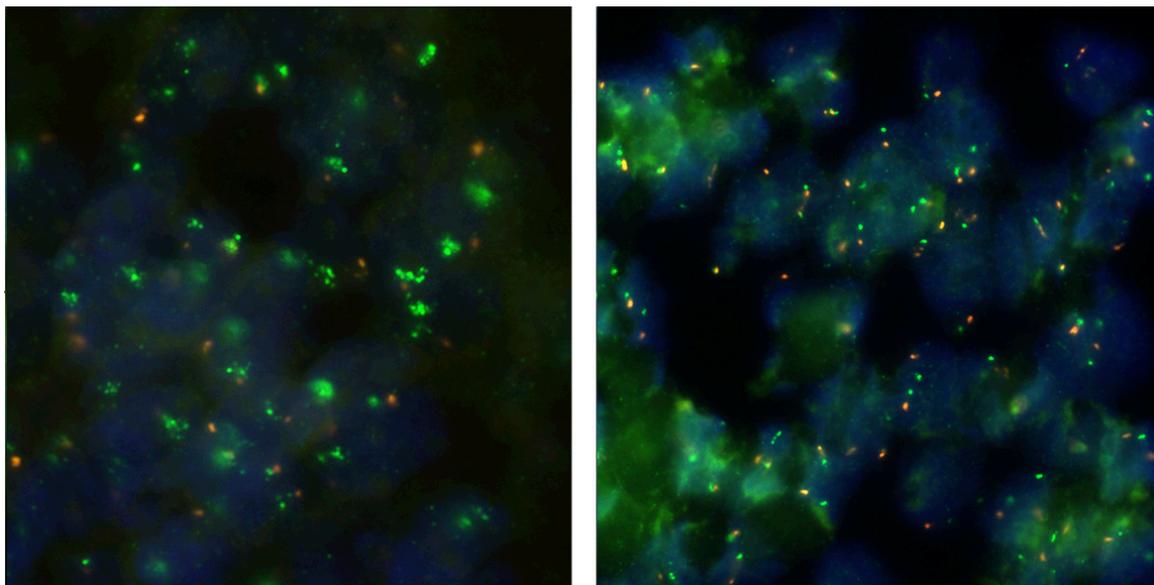
**Tabelle 9** Zusammenhang zwischen *ESR1*-Amplifikation und ER-Expression in Tumoren ( $p = 0.0036$ ) und Hyperplasien ( $p = 0.0816$ ) des Endometriums



**Abbildung 39** Prognostische Aussagekraft des Grades der ER-Expression (a), der *ESR1*-Kopiezahl (b), FIGO-Stadium (c) und histologischem Grad (d) bei den untersuchten Endometriumkarzinomen. Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon, A. Lebeau und N. Seyedi-Fazlollahi (Lebeau, Grob et al. 2008).



**Abbildung 40** Beispiele von Endometriumkarzinomen (a - c), komplexen endometrialen Hyperplasien mit Atypien (d - f) und komplexen endometrialen Hyperplasien ohne Atypien (g - i) sind als entsprechenden HE-Färbungen (a, d, g), durch immunhistochemische Färbung dargestellte hochgradige ER-Proteinexpression (b, e, h) und durch FISH dargestellte *ESRI*-Amplifikationen (c, f, i) gezeigt. In den Abbildungen der FISH markieren die orange-rotten Signale das Zentromer 6, grüne Signale das Gen *ESRI*. \*nicht maligne endometroide Stromazellen ohne *ESRI*-Amplifikation. Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon, A. Lebeau und N. Seyedi-Fazlollahi (Lebeau, Grob et al. 2008).



**Abbildung 41** Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von *ESRI*-amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Endometriumkarzinome. Die *ESRI*-Kopien wurden mit der FISH-Methode grün fluoreszierend markiert. Das Zentromer 6 ist rot bzw. orange markiert. Eigene Aufnahme.

### 3.3 *ESRI*-Amplifikationen beim Ovarialkarzinom

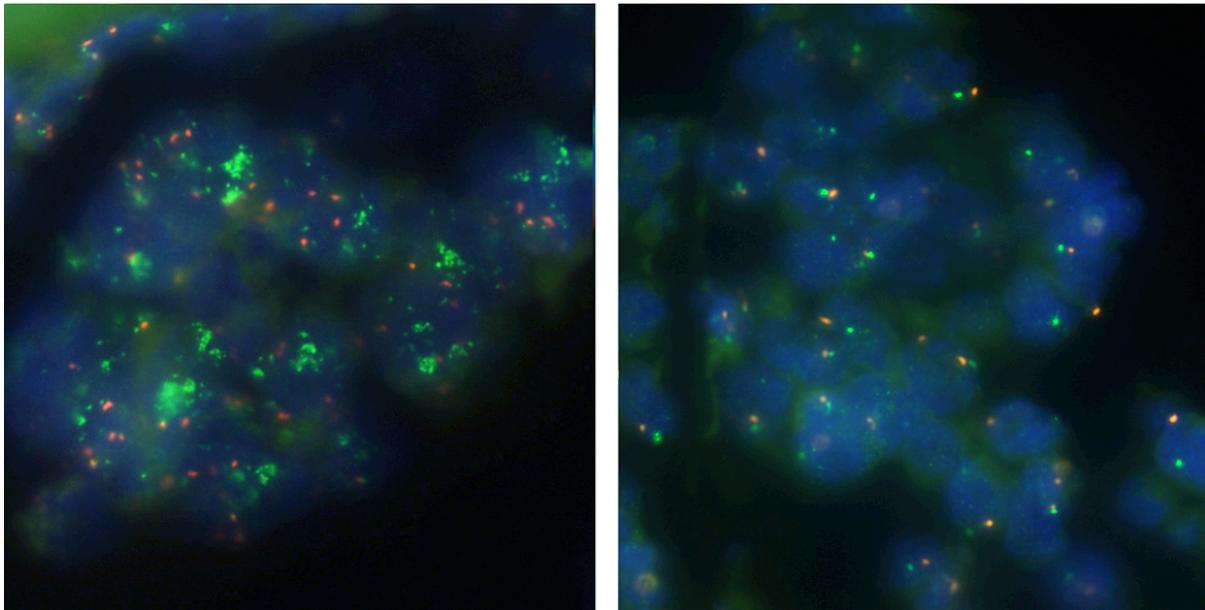
#### 3.3.1 ER-Expression

Der ER-Status konnte für 384 von 428 (89,7 %) Ovarialkarzinomen des verwendeten Arrays erfolgreich bestimmt werden. Insgesamt 43 Fälle waren nicht auswertbar, da entweder kein Tumorgewebe enthalten war ( $n = 19$ ; 4,4 %) oder die „Gewebspots“ verloren gegangen waren ( $n = 24$ ; 5,6 %). Mehr als ein Drittel ( $148 / 384$ , 37,2 %) der Tumore zeigten zumindest eine schwache ER-Expression. Eine ER-IHC-Färbung höchsten Grades (Grad 7 - 8 nach Allred) wurde in 36 von 384 (9,4 %) Fällen nachgewiesen. Diese war mit den hochgradigen Tumoren assoziiert ( $p = 0,038$ ). Ein Zusammenhang der Östrogenrezeptorexpression mit der Prognose konnte nicht gefunden werden ( $p = 0,2491$ , **Abbildung 43**). Die immunhistochemischen Ergebnisse sind in **Tabelle 15** aufgeführt. Beispiele eines immunhistochemisch ER-positiven und eines ER-negativen Tumors sind in **Abbildung 44** gezeigt.

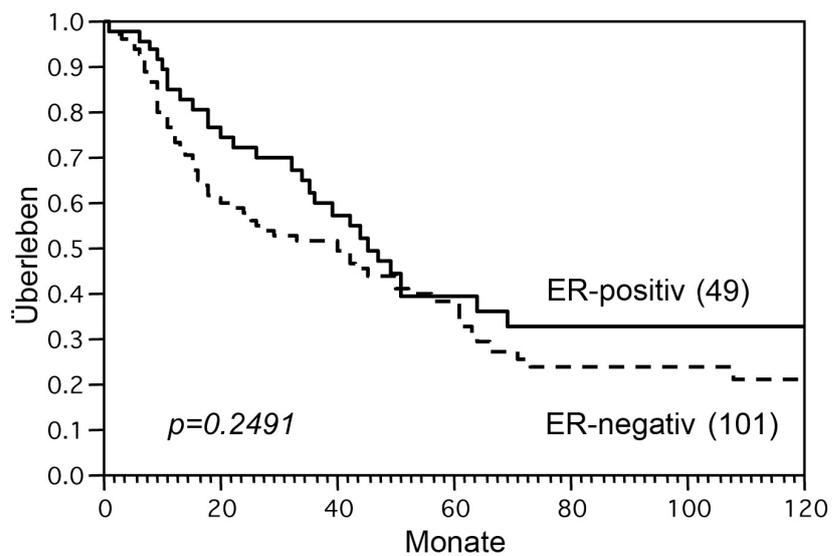
#### 3.3.2 *ESRI* Amplifikation

Der *ESRI*-Status konnte für 243 (56,8 %) der 428 Gewebe des Ovarialkarzinom-TMAs erfolgreich bestimmt werden. Insgesamt 285 Fälle waren nicht analysierbar, da die „Gewebspots“ entweder keine Tumorzellen enthielten, ganze „Gewebspots“ verloren gegangen waren ( $n = 80$ ) oder die FISH-Signale nicht interpretierbar waren ( $n = 105$ ). Gemäß der vorher definierten Kriterien (Ratio *ESRI* / Zentromer 6  $\geq 2,0$ ) zeigten sich in 5 (2,1 %) von 243 analysierbaren Gewebeproben Amplifikationen des Gens *ESRI*. **Abbildung 42** zeigt Beispiele amplifizierter und nicht amplifizierter Tumorzellen. Die amplifizierten Fälle zeigten eine wölkchenförmige Anordnung (Cluster) zusätzlicher *ESRI*-Kopien. Das läßt darauf schließen, daß es sich um intrachromosomale Amplifikationen handelt (HSR-Typ).

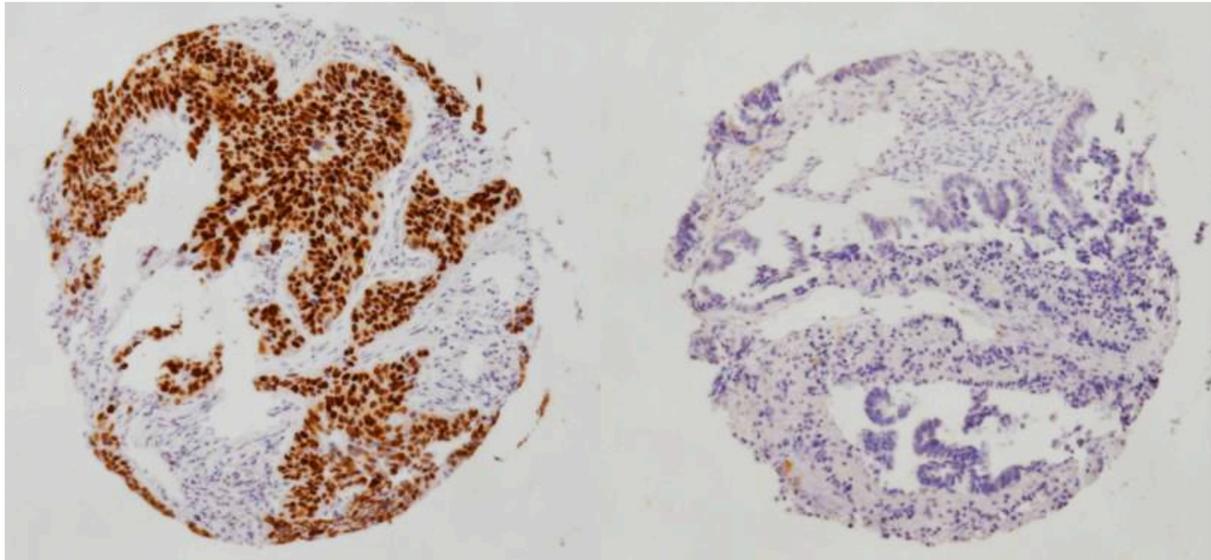
Die Amplifikationen waren normalerweise mit 4 - 8 FISH-Signalen von geringer Kopiezahl. Eine Tumorprobe wies eine sogenannte „high level“-Amplifikation auf ( $> 10$  Signale). Die *ESRI*-Amplifikationen standen nicht in Zusammenhang zu histopathologischen Parametern wie dem histologischen Subtyp, dem Tumorstadium und Tumorgrad. Auf eine Überlebensanalyse wurde aufgrund der geringen Anzahl an amplifizierten Fällen verzichtet. Alle fünf Tumore mit *ESRI*-Amplifikation waren bezüglich der ER-Expression positiv. Die IHC-Färbung war unterschiedlich und in drei von fünf Fällen von starker Intensität.



**Abbildung 42** Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Interphase-Zellkernen (blau) von *ESRI*-amplifizierten (links) und nicht amplifizierten (rechts) Tumorzellen zweier Ovarialkarzinome. Die *ESRI*-Kopien wurden mit der FISH-Methode grün fluoreszierend markiert. Das Zentromer 6 ist rot bzw. orange markiert. Eigene Aufnahme.



**Abbildung 43** Kaplan-Meier Überlebenskurven der of ER-postiven und ER-negativen Ovarialkarzinome. Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und R. Issa (Issa, Lebeau et al. 2009).



**Abbildung 44** Lichtmikroskopische Aufnahmen (100×) histologischer Dünnschnitte (4 μm) von TMA-Gewebeprobe (Ø 0,6 mm) zweier Ovarialtumore als Beispiele eines immunhistochemisch ER-positiven (links) und eines ER-negativen Karzinoms. Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und R. Issa (Issa, Lebeau et al. 2009).

### 3.4 *ESR2*-Kopiezahlen in den Geweben des „Amplifikations-Test-TMA“

Der „Amplifikations-Test-TMA“ wurde mit zwei FISH-Sonden entsprechend den pBAC-Klonen RP11-676P5 und RP11-712C19 auf Kopiezahlveränderungen untersucht. Jeweils 89 der 170 Mammatumorgewebe waren auswertbar. Dabei wurden keine *ESR2*-Kopiezahlzugewinne und auch keine *ESR2*-Deletionen festgestellt. Unter den analysierbaren Geweben befanden sich auch die für die qRT-PCR (Kapitel 2.6) verwendeten Fälle entsprechend der Proben P1, P2, P5, P6, P7, P9, P10, P12, P13 und P14. Die Gewebe entsprechend der qRT-PCR-Proben P3, P4 und P11 waren nicht analysierbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die *ESRI*-Amplifikation beim Mammakarzinom

#### 4.1.1 Die Häufigkeit der *ESRI*-Amplifikation und ihre Verteilung auf die histologischen Subtypen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die *ESRI*-Amplifikation nach heutigem Kenntnisstand zu den häufigsten Genamplifikationen beim Mammakarzinom gehört.

Die entsprechende Amplifikationsrate wurde durch die Verwendung eines Gewebemikroarrays ermittelt, auf dem Dünnschnitte von Gewebeproben mit verhältnismäßig geringem Durchmesser von 0,6 mm analysiert wurden (Kapitel 2.1). Trotz der hierdurch erhöhten Wahrscheinlichkeit, daß *ESRI*-amplifizierte Tumorareale der Analyse entgehen, wurde eine Amplifikationsrate von 20,6 % gefunden. Die Verwendung des selben „Brust-Prognose-TMA“ und der selben Definition für den Status einer Amplifikation, wie in der vorliegenden Arbeit, führte zur Ermittlung einer Amplifikationsrate bei dem Gen *CCND1* von 20,1%, bei *HER2* von 17,3%, bei *MDM2* in 5,7%, bei *MYC* von 5,3% und *EGFR* von 0,8 % der repräsentierenden Tumorgewebeproben (Al-Kuraya, Schraml et al. 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe einer *ESRI*-spezifischen FISH-Sonde, erlaubten die Analyse einzelner Zellkerne innerhalb der Gewebedünnschnitte, durch deren *ESRI*-Kopiezahlerhöhung das Gewebe schließlich als „*ESRI*-amplifiziert“ eingestuft wurde. Eine das Ergebnis verfälschende Heterogenität der Genkopiezahl, bzw. ein ungleichmäßiges Auftreten der Amplifikation oder kontaminierendes Normalgewebe, bzw. Lymphozyten, also „nicht amplifizierte Zellkerne“, können so bei der Analyse identifiziert und ausgeschlossen werden. Hierdurch wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl eine verhältnismäßig zuverlässige Validierung der Amplifikation als auch eine umfangreiche epidemiologische Untersuchung der Amplifikation ermöglicht.

Das verhältnismäßig häufige Auftreten der *ESRI*-Amplifikation in frühen und noch gut differenzierten Mammakarzinomen spricht dafür, daß die *ESRI*-Amplifikation eine entscheidende frühe oder gar initialisierende genetische Eigenschaft bei degenerativen Läsionen des Mammagewebes sein könnte. Daher wurde ebenfalls ein TMA mit prämaligen proliferativen Mammaläsionen analysiert, welcher nicht-neoplastisches und präkanzeröses Gewebe enthielt.

Auch hier konnte die *ESRI*-Amplifikation nicht nur in „Carcinoma in situ“ (35 %), sondern auch in Papillomen (36 %) und in intraduktalen Hyperplasien (8 %) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die *ESRI*-Amplifikation zwar keine eigentlich degenerativ-

entdifferenzierende oder gar an sich malignisierende Veränderung darstellt, jedoch aufgrund der gewebspezifisch großen Bedeutung des Östrogenrezeptors für die biochemische Steuerung der Zellproliferation eine wichtige Funktion beim Wachstum sich möglicherweise weiter genetisch verändernder Zellen hat. So haben schon frühere Studien gezeigt, daß eine hohe ER-Expression in normalem und präkanzerösem Brustgewebe das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms erhöhen könnte (Khan, Rogers et al. 1998; Shoker, Jarvis et al. 1999). Durch die besondere Bedeutung der *ESRI*-Amplifikation für die ER-Expression könnte der *ESRI*-Amplifikationsstatus auch als ein prognostischer Marker bei Patientinnen mit duktalem Hyperplasien, Papillomen oder anderen proliferativen Brusterkrankungen dienen.

Zusammenfassend läßt sich diesbezüglich feststellen, daß die *ESRI*-Amplifikation beim Mammakarzinom eine häufige genetische Veränderung ist, die dazu beiträgt, daß die betroffenen Mammaepithelzellen die normale zellbiologische Proliferationskontrolle umgehen können. Da die Amplifikation offenbar einen besonderen zellulären Mechanismus der positiven Expressionsregulierung darstellt, könnte die Amplifikation auch eine Gruppe von ER-positiven Mammakarzinomen kennzeichnen, die statistisch betrachtet besser von einer antihormonellen Therapie profitieren könnte. Hierbei ist bzgl. der diagnostischen Anwendbarkeit die Frage entscheidend, ob durch die Ermittlung des *ESRI*-Amplifikationsstatus ein Marker zur Verfügung steht, der ein Ansprechen auf eine endokrine Therapie zuverlässiger voraussagen kann als die Ermittlung der ER-Expression mittels IHC. Die Frage nach der Eignung der diagnostischen Methoden FISH und IHC ist bis heute Gegenstand kontroverser methodisch-wissenschaftlicher Diskussionen (Wolff, Hammond et al. 2007; Hammond, Wolff et al. 2009; Sauter, Lee et al. 2009a; Sauter, Lee et al. 2009b; Lebeau, Turzynski et al. 2010).

Weitere klinische Studien sind notwendig, um die klinische Relevanz des *ESRI*-Amplifikationsstatus und die entsprechenden Vorteile gegenüber der IHC-Methode zu validieren.

#### **4.1.2 Vergleich mit der ER-Expression**

Die starke Korrelation der in der vorliegenden Arbeit gefundenen *ESRI*-Amplifikation mit der Expression des ER stellt eine deutliche methodische Bestätigung der durch die FISH-Analyse erhobenen Daten dar. 99 % aller gemäß FISH-Analyse *ESRI*-amplifizierten Fälle wiesen einen der beiden höchsten Werte (7 - 8) der immunhistochemisch (IHC) ermittelten und nach der Allred-Klassifizierung („Allred-Score“) eingeteilten Expressionsgrade auf (**Abbildung**

22). Gleichzeitig hebt dieser Zusammenhang die funktionelle Bedeutung der *ESRI*-Amplifikation hervor.

Wie bei der *HER2*-Amplifikation hat auch die Amplifikation des Gens *ESRI* eine Überexpression des entsprechenden Proteins zur Folge. Allerdings hat eine hohe ER-Expression nicht immer eine Genamplifikation als Ursache, sondern stellt offenbar nur einen Mechanismus zur verstärkten Expression neben anderen Möglichkeiten der Regulierung dar (Vang Nielsen, Ejlertsen et al. 2011) (siehe auch Kapitel 1.2.2). So zeigten, nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, etwa die Hälfte der Tumoren ohne *ESRI*-Amplifikation ebenfalls eine starke Überexpression des ER (**Abbildung 22**).

### 4.1.3 Kartierung des *ESRI*-Lokus

Die Ergebnisse der Analyse des „*ESRI*-Amplifikations-Kartierungs-TMAs“ (Kapitel 3.1.3) zur Kartierung der Ausdehnung der *ESRI*-Amplifikationen zeigen, daß sich das *ESRI*-Amplikon in rund der Hälfte bis zu möglicherweise zwei Dritteln der untersuchten Fälle auf das Gen *ESRI* selbst beschränkt. Hierdurch wurde auch ein Ergebnis der in den Vorarbeiten (Kapitel 1.5) erfolgten Genchip-Untersuchung bestätigt, welche zeigte, daß zumindest eine der beiden Amplifikationen, die mit dem Genchip identifiziert werden konnten, sich ebenfalls auf *ESRI* beschränkt. Eine zusätzliche Analyse der Genchip-Daten in den Vorarbeiten durch Christian Ruiz (Ruiz 2006) zeigte, daß sich auch bei der zweiten detektierten Amplifikation zumindest die durch die Messung und Auswertung ermittelten Maximalwerte ebenfalls auf *ESRI* beschränkten.

Die Kartierung ergab, daß *ESRI* das Zielgen der 6q25 Amplifikation sein muß, da es das einzige Gen ist, das in allen Tumoren in der amplifizierten DNS-Sequenz liegt.

Durch die große Bedeutung des Östrogenrezeptors für das Tumorstadium ist das Auftreten von Amplifikationen mit *ESRI* als Zielgen durchaus naheliegend. Obwohl auch Amplifikationen kleiner genomischer Bereiche unter 1000 kb nicht ungewöhnlich sind (Tanigami, Tokino et al. 1992; Arriola, Marchio et al. 2008), war der Befund, daß sich die Ausdehnung des amplifizierten Bereichs in einem so großen Anteil der Tumore auf einen nur ca. 500 kb großen Bereich und *ESRI* selbst beschränkt, dagegen eher unerwartet. Normalerweise erstrecken sich Amplifikationen genomischer Sequenzen in Tumoren über deutlich größere Bereiche und umfassen eine größere Anzahl an Genen.

Während bei *HER2* beispielsweise eine Co-Amplifikation mit anderen Genen die Regel ist, und die Co-Amplifikation mit dem Gen *TOP2A* auch eine wichtige biochemisch-

molekularbiologische und klinisch-therapeutische Bedeutung hat, scheint dies bei *ESRI* nicht der Fall zu sein.

Die Kartierung des *ESRI*-Amplikons mit Hilfe der FISH-Technik ist durch die Größe der verwendeten pBAC-Klone methodisch eingeschränkt. So stellen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Start- und Endpunkte des jeweiligen *ESRI*-Amplikons, die im Ergebnis entsprechend mit den jeweiligen Endpunkten der jeweiligen Klone übereinstimmen müssen, nur die ungefähre Lage der tatsächlichen Punkte dar. Amplifizierte Bereiche, die nur partiell durch an die ermittelten Endpunkte angrenzenden Klone abgedeckt sind, geben aufgrund ihrer u.U. geringen Größe kein zuverlässig auszuwertendes Signal. Nicht amplifizierte Bereiche dagegen, die an solchen Grenzregionen mit einem Klon überlappen, dessen Sequenz in ausreichender Ausdehnung im amplifizierten genomischen Abschnitt liegt, werden in der Auswertung als amplifiziert eingestuft. So überlappt die Sonde entsprechend Klon RP3-443C4 über 20 kb mit der *ESRI*-Sequenz. Jedoch ergab die FISH-Auswertung mit dieser Sonde in den entsprechend kartierten Fällen kein vermehrtes Signal. Allerdings ist zu vermuten, daß dieser Bereich ebenfalls amplifiziert ist, da anderenfalls Sequenzbereiche von *ESRI* fehlen würden, die für wichtige funktionelle Domänen des gewöhnlicherweise exprimierten ER-Rezeptors kodierenden. Vielmehr ist zu vermuten, daß die *ESRI*-Amplifikation direkt hinter dem Gen *ESRI* endet und die Signale des deutlich größeren, ca. 47 kb großen Bereichs, welcher sich nicht mit der *ESRI*-Sequenz überschneidet, deutlicher sind als diejenigen des kleineren 20 kb *ESRI*-überlappenden Bereichs. Zusätzlich zur geringeren Größe hat die *ESRI*-überlappende Sequenz von RP3-443C4 einen deutlich geringeren GC-Gehalt und damit vermutlich wesentlich schlechtere DNS-bindende Eigenschaften als die übrige ca. 47 kb lange Sequenz außerhalb von *ESRI*. Daher liegt es nahe, daß die *ESRI*-bindenden Sondenfragmente nicht leuchtstark genug sind, um als zusätzliche FISH-Signale erkannt zu werden. Daher ist zu vermuten, daß der 5'-Endpunkt der jeweiligen *ESRI*-Amplifikationen im entsprechenden Bereich des Klons RP3-443C4 liegt. Zudem stand der Klon RP11-404G5 nicht für die Kartierung zur Verfügung, wodurch in vier Fällen (2i, 1n, 2a, 2f) nicht festgestellt werden konnte, ob sich die Amplifikation auf *ESRI* beschränkt (siehe **Abbildung 24**).

Folgend ist es erforderlich, Experimente größerer Auflösung zur Kartierung der auf *ESRI* beschränkten Amplikons durchzuführen. Hierzu würde sich eine Analyse durch hochauflösende Genchips anbieten, welche heute bereits über die zehnfache Auflösung des „10K SNP Arrays“ verfügen, dessen Daten der vorliegenden Arbeit zugrunde lagen.

Eine noch genauere Möglichkeit des *ESRI*-Amplikon zu vermessen, wäre die in den letzten Jahren etablierte Methode des „Next-Generation-Sequencing“, auch „Deep-Sequencing“ genannt. Durch diese Methode wäre eine Bestimmung des amplifizierten Bereichs mit einer basengenauen Auflösung möglich (Su, Ning et al. 2011).

Jedoch unterliegt auch diese Methode der Limitierung, die auch die Möglichkeiten der qPCR und der Genchips begrenzt (Kapitel 4.4.3). Da auch mit diesen Methoden nur die durchschnittliche Ratio von Kopiezahlen der in der Probe vorhandenen Sequenzen festgestellt werden können, müßte, aufgrund der resultierenden Schwierigkeit bei der Nachweisbarkeit von Amplifikationen mit geringer Kopiezahl, mit entsprechend sorgfältig ausgewählten Fällen gearbeitet werden.

Die Ausdehnung des *ESRI*-Amplikons, die sich in einem Großteil der untersuchten Fälle auf *ESRI* selbst beschränkt, weist darauf hin, daß das *ESRI*-Amplikon in diesen Fällen möglicherweise nicht durch den sogenannten „Breakage-Fusion-Bridge-Mechanismus“ entsteht, da es naheliegender scheint, daß dieser eher größere und weiträumiger gestreute Start- und Endpunkte des Amplikons, wie etwa bei der *HER2*-Amplifikation, erzeugen würde. Besser würde das Modell des Replikationsgabelmechanismus zu den empirischen Daten passen. Daß jedoch so häufig eine allein auf *ESRI* beschränkte Amplifikation auftritt, während dies bei anderen Genen zumindest bisher nicht beschrieben ist, würde sich gut durch einen Mechanismus erklären lassen, an dem eine Form der somatischen homologen Rekombination beteiligt ist. So sind Mechanismen der homologen Rekombination beschrieben, welche durch sogenannte „Mikrohomologien“ vermittelt werden, die sich auf Sequenzlängen von nur ca. 5 - 25 Basen beschränken können (Bennardo, Cheng et al. 2008; Hastings, Ira et al. 2009; Hastings, Lupski et al. 2009; McVean 2010). Tatsächlich gibt es auch Hinweise auf Homologien größerer Ausdehnung in der Region von *ESRI*. So bestehen offenbar auf Nukleotidebene Sequenzhomologien von *ESRI* mit drei offenen Leserahmen (engl.: „open reading frame“ (ORF)) in der direkten Nachbarschaft auf der 5'-Seite von *ESRI* (Dunbier, Anderson et al. 2011). Einer dieser Leserahmen, der C6orf97, liegt nur rund 150 kb von der genomischen Sequenz entfernt, die für das Haupttranskript von *ESRI* kodiert.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der Kartierung des *ESRI*-Amplikons ist der Befund, daß die Amplifikation auf der telomerischen Seite von *ESRI* (3'-Seite) in 22 von 24 Fällen um einen Sequenzbereich entsprechend Klon RP11-434E7 endet. Auf der 5'-Seite dagegen enden nur 16 Fälle so kontinuierlich im Bereich entsprechend Klon RP3-443C4 (**Abbildung 24**). Das Ende der Amplifikation ist möglicherweise auf der 5'-Seite von der Lage her flexibler als auf der 3'-Seite und hier relativ deutlich auf den entsprechenden Bereich um die Sequenz

entsprechend Klon RP11-434E7 festgelegt. Dies legt die Vermutung nach entsprechend liegenden Sequenzen, womöglich Sequenzhomologien nahe, welche die Amplifizierung von *ESRI* vermitteln.

So ist es vorstellbar, daß die Häufigkeit der *ESRI*-Amplifikation und ihre Beschränkung auf *ESRI* durch Homologien verursacht wird, die das Gen eng flankieren. Dieser Entstehungsmechanismus ist vom BFB-Mechanismus unabhängig und daher, im Vergleich zu anderen Genamplifikation, vermutlich tendenziell eher weniger mit entsprechend hoher genetischer Instabilität assoziiert. Dies würde auch die Beobachtung erklären, daß die *ESRI*-Amplifikation häufiger in „low grade“ (Grad 1) und nicht metastasierten Tumoren auftritt. Nach heutigem Stand der Forschung treten Genamplifikationen (z.B.: *HER2*, *MYC*, *EGFR*) im allgemeinen dagegen vor allem in fortgeschrittenen „high grade“ (Grad 3) und metastatischen Tumoren auf.

Die häufig auf die Gensequenz beschränkte Ausdehnung des *ESRI*-Amplikons und die bisweilen von Zellkern zu Zellkern innerhalb eines *ESRI*-amplifizierten Gewebes in der FISH-Analyse stark variierenden *ESRI*-Kopiezahlen lassen einen in der Tumorentwicklung früh auftretenden flexiblen Amplifikationsmechanismus möglich erscheinen (Bruder, Piotrowski et al. 2008; Piotrowski, Bruder et al. 2008; Hastings, Ira et al. 2009; Hastings, Lupski et al. 2009). Die entsprechenden Auswirkung der Genamplifikation könnten hierbei auch als eine Anpassungserscheinung an Konzentrationen des Östrogenspiegels auftreten. So gibt es entsprechende Hinweise aus Zellkulturexperimenten (Aguilar, Sole et al. 2010). Solche Anpassungen durch Genamplifikation sind auch als humanevolutionäre Vorgänge durch die Amplifikation des Amylase-Gens *AMY* bekannt (Perry, Dominy et al. 2007).

#### **4.1.4 Prognostische Relevanz der *ESRI*-Kopiezahlvermehrungen**

Das Steroidhormon Östrogen und sein zellulärer Rezeptor, Östrogenrezeptor-alpha (ER), sind Schlüsselmoleküle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse (siehe auch Kapitel 1.2.2). Gleichzeitig stellen Genamplifikationen einen wichtigen Mechanismus für die Überaktivierung solcher Wachstumsfaktoren wie dem Östrogenrezeptor dar (siehe auch Kapitel 1.3). Auch für die *ESRI*-Amplifikation ist nach der Veröffentlichung der entsprechenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Holst, Stahl et al. 2007) auch die postulierte Eigenschaft der Resistenzvermittlung gegenüber der endokrinen Therapie beim ER-positiven Mammakarzinom publiziert worden. In diesem Fall als eine Tumoreigenschaft, die im Gegensatz zum Beispiel der *AR*-Amplifikation (siehe Kapitel 1.3) schon vor der Therapie vorhanden ist (Vang Nielsen, Ejlertsen et al. 2011). Wie in Kapitel 4.4.3

beschrieben, basieren diese Daten von Vang Nielsen et al. auf einer wesentlich geringeren Amplifikationsrate (hochgerechnet 6,5 %) als der durch diese Arbeit ermittelten. Nun entspricht diese Amplifikationsrate von rund 7 % einem Drittel der durch diese Arbeit festgestellten rund 21 %. Dies entspricht wiederum dem bei der Kartierung in der vorliegenden Arbeit ermittelten Anteil an Mammatumoren mit *ESR1*-Amplifikationen, die in ihrer Ausdehnung wesentlich über die *ESR1*-Sequenz hinausgehen. So ist vorstellbar, daß diese Amplifikationen möglicherweise durch einen anderen molekulargenetischen Mechanismus entstehen könnten, als diejenigen *ESR1*-Amplifikationen, welche sich auf *ESR1* selbst beschränken. So könnte der Mechanismus, der weitaus längere amplifizierte Sequenzen als nur die *ESR1*-Sequenz zur Folge hat, mit einer größeren genetischen Instabilität einhergehen (Kapitel 1.3.2). Weiter ist vorstellbar, daß diese Tumore in wesentlich stärkerem Maße ebenfalls andere genetische Veränderungen wie u.a. auch zusätzliche Genamplifikationen tragen. Dadurch würde ein schlechteres Ansprechen dieser Fälle auf eine endokrine Therapie nicht unbedingt auf die vorliegende *ESR1*-Amplifikation selbst zurückzuführen sein, sondern auf die zusätzlich begleitenden genetischen Veränderungen bzw. Genamplifikationen, wie etwa *HER2*-Amplifikationen, welche dem Tumor andere Proliferationssignalwege ermöglichen. *ESR1*-Amplifikationen, welche aufgrund der Länge der sich nacheinander wiederholenden Sequenzen in der FISH-Analyse einen größeren Signalabstand aufweisen und zusätzlich, möglicherweise aufgrund des sich häufiger wiederholenden, auf stärkerer genetischer Instabilität beruhenden Entstehungsmechanismus, eine höhere Kopiezahl aufweisen, sind mit dieser Methode der optischen Analyse leichter zu identifizieren. Reduziert man bei der FISH-Analyse die als amplifiziert gewerteten Tumore auf Fälle mit solchen leichter erkennbaren Amplifikationen, könnten die dann festgestellten *ESR1*-Amplifikation, neben dem Phänomen des „receptor overcrowding“ (siehe Kapitel 1.3) lediglich eine Art Indikator für stärkere genetische Instabilität und tendenziell vermehrt auftretende genetische Aberrationen und deren Resistenzvermittlung gegenüber einer endokrinen Therapie darstellen.

Bei Brustkrebs spielt die Amplifikation des Gens *HER2* und des benachbarten Gens *TOP2A* ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Therapie. Die *HER2*-Amplifikation vermittelt ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Herceptin, einem Antikörper-Therapeutikum, das sich gegen den *HER2*-Rezeptor richtet, der durch *HER2* kodiert wird, während die *TOP2A*-Amplifikation eine Vorhersage bzgl. des Ansprechens auf die Therapie mit Anthrazyklinen zuläßt. Hierbei scheint jeweils das Vorhandensein einer Amplifikation des entsprechenden Gens ein besserer bzw. zuverlässigerer Biomarker bzgl. des therapeutischen Ansprechens zu

sein als der Grad der über die IHC-Methode ermittelten Proteinexpression (Jarvinen, Tanner et al. 2000; Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005; Mass, Press et al. 2005).

Die oft größere Bedeutung des Amplifikationsstatus gegenüber dem durch IHC ermittelten Expressionsstatus bzgl. der Vorhersagekraft für ein therapeutisches Ansprechen liegen wahrscheinlich zumindest auch der IHC-Methode eigene technische Schwierigkeiten zugrunde. So ist die Färbeintensität z.B. auch durch die Vorbehandlung des formalinfixierten Gewebes beeinflusst. Zudem steht bei der IHC-Methode kein Indikator zur Verfügung, der zuverlässig auszusagen vermag, mit welcher Qualität bzgl. der Färbeintensität die Färbung funktioniert hat. Daher ist es nicht möglich, falsch negative oder falsch positive Ergebnisse zu identifizieren, was einen bedeutenden Nachteil gegenüber der FISH-Methode darstellt. Dieses Problem scheint auch gerade bei dem immunhistochemischen Nachweis des ER eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen (Roepman, Horlings et al. 2009).

Durch die direkte Erhöhung der Kopiezahl eines Gens kann ein spezifischer Mechanismus der Zelle auf eine verhältnismäßig effizient direkte Weise hochreguliert werden. Dadurch scheint es auch erklärbar, daß Amplifikationsmechanismen als alternativer Mechanismus zur häufig komplexeren positiven Regulation der Genexpression im Selektionsprozeß eine entsprechend bedeutende Rolle spielen können. Dem folgend könnte in Verbindung mit der entsprechenden biochemische Konstitution des Gewebes bzgl. des betreffenden zellularen Signalwegs eine Genamplifikation einen solch großen Wachstumsvorteil darstellen, daß in der Karzinogenese und Progression andere genetische Veränderungen in ihrer Bedeutung auch im Selektionsprozeß zurücktreten. So würde die Besonderheit der betreffenden Genamplifikation entsprechend an Bedeutung gewinnen. Insofern wäre es auch naheliegend, wenn Amplifikationszielgene, bzw. deren Genprodukte und die betreffenden biochemischen Reaktionswege, besonders empfindliche Ziele einer Tumorthherapie darstellen.

Eine alternative Erklärung für den prädiktiven Effekt der *ESRI*-Amplifikation könnte also neben der hohen Expression der Tumore mit *ESRI*-Amplifikation im Vergleich zu den Tumoren ohne *ESRI*-Amplifikation die Möglichkeit sein, daß *ESRI*-amplifizierte Tumore stärker vom ER-Signalweg abhängig sind als andere Tumore, die den Östrogenrezeptor zusammen mit vielen anderen Wachstumsrezeptoren exprimieren. Wenn letztere Hypothese zuträfe, würde die Visualisierung der *ESRI*-Amplifikation die Achillesverse eines Tumors offenbaren, die besonders erfolgreich angegriffen werden könnte.

Entsprechend bilden die Tumore mit *ESRI*-Amplifikation, den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgend, eine Untergruppe unter den stark ER-positiven Mammakarzinomen, die besonders gut auf eine Tamoxifen-Therapie anspricht.

Diese konkrete Bedeutung der Amplifikation des Gens des Östrogenrezeptors war jedoch aufgrund der erwähnten resistenzvermittelnden Eigenschaften von amplifizierten Onkogenen nicht selbstverständlich zu erwarten.

Mit Hilfe der klinischen Daten allerdings, die von 175 der erfolgreich mit der FISH-Methode analysierten Patientinnen, welche eine Monotherapie mit Tamoxifen erhalten hatten, zur Verfügung standen, konnte der Einfluß der *ESR1*-Amplifikation auf das Ansprechen auf eine entsprechende Therapie statistisch untersucht werden. Obwohl die zugrunde liegende Anzahl der Patientinnen für entsprechende statistische Berechnungen verhältnismäßig gering ist, konnte ein deutlicher Überlebensvorteil für die Patientinnen mit *ESR1*-amplifiziertem Tumor ermittelt werden. Dieser statistische Zusammenhang erstreckte sich gleichermaßen über die untersuchte Untergruppe und war der entsprechenden multivariaten Analyse zufolge unabhängig von Differenzierungsgrad, Tumorstadium und Nodalstatus (siehe auch Kapitel 3.1.6). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß *ESR1*-amplifizierte Tumore eine Gruppe von ER-positiven Mammakarzinomen definieren könnte, die besonders gut auf eine endokrine Therapie anspricht. Diese Gruppe von Patientinnen käme so möglicherweise für Therapieansätze in Frage, bei denen weitere Behandlungen, wie etwa mit Chemotherapeutika, die mit starken Nebenwirkungen einhergehen, reduziert werden könnten.

## 4.2 Die *ESR1*-Amplifikation beim Endometriumkarzinom

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, daß die Amplifikation des Gens des Östrogenrezeptors (*ESR1*) in über 20 % der Endometriumkarzinome vorkommt. Dies macht die *ESR1*-Amplifikation zu einer der häufigsten genetischen Veränderungen bei diesem Tumortyp. Was die Rolle der *ESR1*-Amplifikation betrifft, legen die Daten nahe, daß es hier bedeutende Ähnlichkeiten zwischen Endometrium- und Brusttumoren gibt. Nahezu alle *ESR1*-amplifizierten Tumore wiesen eine ER-Proteinexpression vom höchsten Grad auf, während nur zwei Drittel der nicht amplifizierten Tumore eine Überexpression zeigten.

Dieser Befund weist darauf hin, daß die *ESR1*-Amplifikation beim Krebs des Endometriums, ebenso wie beim Brustkrebs (siehe Kapitel 1.3 und 4.1.4), ein Mechanismus zur ER-Überexpression sein könnte.

Die höchste *ESR1*-Kopiezahlerhöhung („gain“ und Amplifikation) wurde in endometroiden Karzinomen festgestellt, welche als hoch östrogenabhängig bekannt sind (Silverberg, Kurman et al. 2003) (siehe auch Kapitel 3.2).

Die *ESR1*-Amplifikation trat, in einer geringeren Rate, ebenfalls in allen anderen endometrialen Karzinom-Subtypen auf. Dies illustriert, daß ungeachtet dessen, welche

anderen Signalwege aktiviert sein könnten, die *ESRI*-Amplifikation und die entsprechende ER-Überexpression wahrscheinlich einen wachstumsstimulierenden Effekt auf Krebszellen, die aus dem Endometrium hervorgehen, hat. Anders als beim Brustkrebs konnte allerdings keine klare Assoziation zu Tumoren niedrigen Grades, frühem Stadiums oder zu einem bestimmten Subtyp des Endometriumkarzinoms gefunden werden.

Dies mag durch die verhältnismäßig geringe Zahl der analysierten Gewebeproben, sowohl der Tumore mit fortgeschrittenem Status als auch der serösen Tumore, begründet sein.

Das Fehlen prognostischer Relevanz der ER-Expression war, angesichts der kontroversen Komplexität dieser Thematik, nicht unerwartet.

Während frühere Publikationen die ER-Expression mit Grad, Status und Krankheitsverlauf in Zusammenhang stellten und diese sogar als selbstständigen prognostischen Faktor diskutierten (Geisinger, Marshall et al. 1986; Ehrlich, Young et al. 1988; Ingram, Rosenman et al. 1989; Carcangiu, Chambers et al. 1990; Creasman 1993; Kadar, Malfetano et al. 1993; Nyholm, Christensen et al. 1995), wurden diese Befunde durch jüngere Studien nicht bestätigt (Iversen, Utaaker et al. 1988; Lukes, Kohler et al. 1994; Sivridis, Giatromanolaki et al. 2001; Silverberg, Kurman et al. 2003; Jeon, Park et al. 2006). Entsprechend wurde die alte Empfehlung des „USA National Cancer Institute“ den ER-Status in die Einstufung des endometrialen Krebses, zumindest des FIGO-Status I und II, heranzuziehen, in der derzeitigen WHO-Klassifikation revidiert (Silverberg, Kurman et al. 2003).

Zudem mag der große Anteil an ER-positiven Tumoren (88,5 %) und die vergleichsweise kurze Dokumentation des postoperativen Krankheitsverlaufs in den für diese Arbeit verwendeten Geweben nicht optimal geeignet sein, um die Fragestellung der prognostischen Signifikanz des ER-Status beim Krebs des Endometriums zu beantworten.

Bei Brustkrebs repräsentiert der ER das bedeutendste therapeutische Ziel und der ER-Expressionsstatus wird hier routinemäßig bei allen neu diagnostizierten Brustkrebspatientinnen erhoben.

Über 60 % der Brustkrebspatientinnen werden heutzutage mit einer Antiöstrogentherapie behandelt. Die klinische Relevanz der ER-Expression ist beim Krebs des Endometriums dagegen viel weniger eindeutig.

Obwohl hohe Östrogenspiegel und die Überexpression des Östrogenrezeptors im allgemeinen als förderlich für das Wachstum der meisten Tumore angesehen werden (Silverberg, Kurman et al. 2003), blieben die Ergebnisse von Antiöstrogentherapien in frühem und fortgeschrittenen Stadien des Krankheitsverlaufs überwiegend enttäuschend (Thigpen, Brady et al. 2001).

Durch die Untersuchungen bei Brustkrebs (Kapitel 3.1) konnte gezeigt werden, daß *ESR1*-amplifizierte Tumore möglicherweise optimal durch eine Antiöstrogentherapie profitieren könnten (Holst, Stahl et al. 2007). Dies verleitet zu der Spekulation, der *ESR1*-amplifizierte Krebs des Endometriums könnte auf eine Antiöstrogentherapie ansprechen. Jedoch sprechen die bisherigen empirischen Daten nicht dafür, daß der ER-Status bzw. der *ESR1*-Amplifikationsstatus beim Krebs des Endometriums eine ähnlich eindeutige Rolle spielt wie beim Brustkrebs. Vielmehr deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wie auch die Daten aus der Literatur darauf hin, daß die Rolle des Östrogenrezeptors und entsprechend die Bedeutung der *ESR1*-Amplifikation beim Endometriumkarzinom weit komplexer, widersprüchlicher und damit als klinischer Biomarker viel weniger aussagekräftig ist als beim Mammakarzinom. Diese Beobachtung korrespondiert gut mit der Feststellung einer differenziellen, variablen und auch heterogenen Expression unterschiedlicher Östrogenrezeptor-Isoformen und -Isotypen im Krebs des Endometriums (Bergeron, Ferenczy et al. 1988; Marsigliante, Muscella et al. 1995; Brandenberger, Lebovic et al. 1999) (siehe auch Kapitel 1.2.2.2, **Abbildung 2**).

Um die Frage zu klären, ob die *ESR1*-Amplifikation, wie beim Mammakarzinom, auch in Vorläuferläsionen des Endometriumkarzinoms eine Rolle spielen, wurden verschiedene Fälle von komplexer atypischer Hyperplasie, einfacher und komplexer Hyperplasie ohne Atypie untersucht. Die atypische komplexe Hyperplasie ist eine prämaligne Veränderung, die sich unbehandelt in etwa 30 % der Fälle zu Krebs entwickelt (Baak, Mutter et al. 2005).

Die ähnliche Häufigkeit der *ESR1*-Amplifikation in atypischen komplexen Hyperplasien (32 %), wie in den malignen Tumoren, die aus diesen Läsionen entstehen, legen nahe, daß die *ESR1*-Amplifikation eine frühe genetische Veränderung dieser Tumore darstellen könnte. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit bei komplexen Hyperplasien ohne Atypien (30 %) eine vergleichbar große Rate an *ESR1*-Amplifikationen beobachtet werden, was darauf hinweist, daß *ESR1*-Kopiezahlveränderungen atypische morphologische Veränderungen fördern könnten.

Dieser Befund zeigt wiederum eine Ähnlichkeit mit der Situation bei Brustkrebs, wo *ESR1*-Amplifikationen sogar in Läsionen der Brust gefunden wurden, die keine morphologischen Merkmale der Prämaliginität aufweisen (Holst, Stahl et al. 2007). Obwohl die Anzahl der Proben, welche bezüglich des Endometriumkarzinoms in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, vergleichsweise klein war, konnten unsere Daten zeigen, daß *ESR1*-Amplifikationen eine häufige Veränderung bei Endometriumkarzinomen und seinen Vorläuferläsionen sind.

Der Entwicklungsmechanismus und die potentielle klinische Relevanz bleibt allerdings ungeklärt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, daß *ESRI*-Amplifikationen häufig in Geweben mit hoher Transkriptionsaktivität dieses Gens vorhanden sind, und daß diese Genamplifikation möglicherweise ein, wenn nicht das initiale Ereignis zur malignen Transformation ist, allerdings vermutlich ohne den allgemeinen molekularpathologischen Charakter des Endometriumkarzinoms so eindeutig zu prägen, daß die *ESRI*-Amplifikation zu einem dominierend klinisch aussagekräftigen Biomarker wird.

So ist vorstellbar, daß *ESRI*-Amplifikationen und die entsprechende ER-Überexpression der Zelle durch die Überaktivierung von gewebespezifischen Zielgenen, als Folge des abnorm verstärkten ER-Signalweges, einen besonderen Wachstumsvorteil verschaffen (Kapitel 1.3).

Daher kann das besonders gute Ansprechen der *ESRI*-amplifizierten Brustkarzinome auf Tamoxifen vermuten lassen, daß Wachstum und Überleben *ESRI*-amplifizierter Zellen sehr von einem abnormal stark aktivierten Östrogenignalweg abhängen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich eine *ESRI*-Amplifikation unter dem Einfluß einer Tamoxifen-Therapie herausbildet. Bei unvollständiger Blockade des Östrogenrezeptors durch Tamoxifen z.B. könnte die *ESRI*-Amplifikation durch Resistenzvermittlung einen Selektionsvorteil für die Krebszellen darstellen (siehe auch Kapitel 1.3 und 4.1.4). Die Information, ob die Patientinnen, deren Daten der vorliegenden Arbeit zugrunde lagen, schon zuvor eine Tamoxifen-Therapie erhalten haben, war für die vorliegende Untersuchung nicht zu ermitteln.

Die große Anzahl amplifizierter Fälle (23 %) zeigt zumindest, daß sich die *ESRI*-Amplifikation auch ohne Tamoxifen-Exposition entwickeln kann, da der Anteil an durch Tamoxifen induzierten Endometriumkarzinomen niedriger einzuschätzen ist. Vor allem deswegen, weil das Risiko hierdurch ein Endometriumkarzinom zu entwickeln zwei- oder dreifach höher ist als bei einer vergleichbaren Alterspopulation (ACOG 2006).

Zusammengefaßt unterstützen die Daten der vorliegenden Arbeit einen funktionellen Zusammenhang zwischen *ESRI*-Amplifikation und Überexpression des Östrogenrezeptors im Krebs des Endometriums und seinen Vorläuferläsionen.

Die potentielle Rolle der *ESRI*-Amplifikation für die Entwicklung des Endometriumkarzinoms muß weiter geklärt werden. Unter Berücksichtigung der festgestellten Assoziation zwischen *ESRI*-Amplifikation und dem Ansprechen auf Tamoxifen bei Brustkrebs, ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß der Amplifikationsstatus dieses Gens bei der Konzeption einer endokrinen Therapie beim Krebs des Endometriums ebenfalls

---

ein hilfreicher Parameter sein könnte. Da jedoch der ER-Status an sich und die Wirkung von endokrinen Therapeutika wie Tamoxifen beim Krebs des Endometriums eine viel widersprüchlichere und komplexere Erscheinung darstellen als beim Mammakarzinom, kann der *ESR1*-Amplifikationsstatus nur unter Berücksichtigung dieser Komplexität und entsprechenden weiteren, zumindest diesbezüglich, bislang weitgehend unbekanntem bzw. unverstandenen molekularbiologisch- biochemischen Parametern eine klinische Bedeutung haben.

### 4.3 Die *ESRI*-Amplifikation beim Ovarialkarzinom

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die *ESRI*-Amplifikation beim Krebs des Ovars selten ist (2,1 %). Mehr als ein Drittel der Ovarialtumore zeigten eine immunhistochemisch nachweisbare Expression des Östrogenrezeptors, welche meist in serösen und endometrioiden Subtypen hoch ist.

Dieser Befund entspricht vorangegangenen Studien mit klassischen Paraffingewebe-Großschnitten. Die große Übereinstimmung zwischen den Daten der vorliegenden Arbeit und vorangegangenen Untersuchungen belegen das repräsentative Potential von Daten bzgl. Tumorgewebe-Mikroarrays, die einem 0,6 mm „Gewebspot“ pro Tumor zur Grundlage haben und unterstützen die Ergebnisse anderer Untersuchungen, die diese Methode verwenden.

Die *ESRI*-Amplifikation spielt im Gegensatz zum Endometriumkarzinom und vor allem unter Berücksichtigung der potentiellen klinischen Bedeutung, im Gegensatz zum Mammakarzinom, beim Ovarialkarzinom keine bedeutende Rolle. Nur in einem geringen Ausmaß waren ER-positive und gleichzeitig *ESRI*-amplifizierte Fälle auch im Krebs des Ovars nachzuweisen.

Andere Gene zeigten vergleichsweise höhere Amplifikationsraten in diesen Tumoren. Die Amplifikation des Gens *HER2* beispielsweise variiert (0-66 %) (Leary, Edwards et al. 1992; Wu, Lin et al. 2003) *EGFR* (3,65-12 %) (Dimova, Raitcheva et al. 2006; Lassus, Sihto et al. 2006), *CCND1* (0-19 %) (Courjal, Louason et al. 1996; Masciullo, Scambia et al. 1997; Diebold, Mosinger et al. 2000), *MYC* bis zu 54,5 % (Xin 1993; Bian, Fan et al. 1995; Wu, Lin et al. 2003), und *KRAS* (31 %) (Bian, Fan et al. 1995).

Die bedeutende Häufigkeit der ER-Positivität beim Krebs des Ovars legt nahe, eine frühe Behandlung mit einer endokrinen Therapie anzustrengen. Zudem war die relativ geringe Toxizität ein weiterer Faktor, der einen Anreiz darstellte, Fortschritte in diesem therapeutischen Feld zu erzielen. Studien über Monotherapien mit Tamoxifen, Aromataseinhibitoren und GnRH-Analoga ergaben verschiedene Ergebnisse mit objektiven Ansprechraten, die sich zwischen 0 und 56 % bewegen (Clinton and Hua 1997; Makar 2000; Trope, Marth et al. 2000; Perez-Gracia and Carrasco 2002; Balbi, Piano et al. 2004; Cunat, Hoffmann et al. 2004; Papadimitriou, Markaki et al. 2004; Levine, Park et al. 2007; Li, Hu et al. 2008). Kombinatorische Behandlungen mit Tamoxifen und Goserelin oder Tamoxifen und Gefitinib brachten Ergebnisse mit objektiven Ansprechraten von bis zu 11, 5 % (Hasan, Ton et al. 2005; Wagner, du Bois et al. 2007).

Für einige dieser Studien wurden die Patientinnen aufgrund ihres immunhistochemisch ermittelten ER-Status ausgewählt. Es ist hier daher ungeklärt, ob der Grad der ER-Expression irgendeinen Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens hat, bzw. ob sich hier nicht auch Effekte zeigen, die auf einen Mangel an wohl organisierter Behandlungsstrategie bei zuvor intensiv behandelten Patientinnen zurückzuführen ist, welche in bedeutendem Ausmaß schon an fortgeschrittenem Krankheitsstadium litten.

Die Rolle der ER-Expression als Prädiktionsparameter für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie wurde weitaus besser für Brustkrebs untersucht, wo ein starker Zusammenhang zwischen ER-Positivität und dem Ansprechen auf eine endokrine Therapie anerkannt ist.

Nicht in allen Fällen von ER-positiven Brustkrebs jedoch sprechen die Patientinnen auf eine endokrine Therapie an.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, könnte die *ESR1*-Amplifikation bei ER-positiven Brusttumoren die relative Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie vorhersagen.

Über 20 - 30 % der Brusttumore hatten nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine amplifizierte oder zumindest erhöhte *ESR1*-Kopiezahl. Im Zusammenhang mit der klinischen Bedeutung dieser Abberation nimmt die *ESR1*-Amplifikation beim Brustkrebs daher eine entsprechende Bedeutung ein (siehe auch Kapitel 3.1.6 und 4.1.4). Die Häufigkeit von *ESR1*-amplifizierten Ovarialtumoren (2,1 %) ist jedoch deutlich niedriger als bei Brustkrebs. Interessanterweise entspricht dieser prozentuale Anteil dem derjenigen Ovarialtumoren, welche stark auf eine endokrine Therapie ansprechen.

In retrospektiven Untersuchungen wurde beispielsweise festgestellt, daß von 29 geeigneten Patientinnen, die zur Behandlung von fortgeschrittenem epithelalem Krebs des Eierstocks zweimal täglich 20 mg Tamoxifen erhielten, 1 Patientin (3 %) voll ansprach und 2 (7 %) Patientinnen teilweise ansprachen. Bei 6 (21 %) Patientinnen konnte die Tumorprogression gestoppt und die Tumorausdehnung damit stabil gehalten werden. 20 (69 %) der Patientinnen hatten weiterhin eine Tumorprogression (Karagol, Saip et al. 2007). Papadimitriou et al. (Papadimitriou, Markaki et al. 2004) haben Ansprechraten für 27 Patientinnen untersucht, die mit 2,5 mg Letrozole pro Tag behandelt wurden. Patientinnen mit meßbarer oder feststellbarer Erkrankung (n = 21) und solche mit lediglich erhöhtem CA 125 Serumspiegel (n = 6) waren für die Studie geeignet. Von den 21 Patientinnen mit meßbarer oder feststellbarer Erkrankung sprach eine Patientin (5 %) vollständig und zwei Patientinnen (10 %) teilweise an. 35 Patientinnen zeigten ein objektives Ansprechen (15 %).

Bei anderen Studien, denen die kombinierte Therapie zugrunde lag, wurde zweimal täglich 20 mg Tamoxifen auf einer kontinuierlichen Grundlage von 3,6 g einmal monatlich bis zur Tumorprogression subkutan Goserelin gegeben.

Insgesamt 26 Patientinnen nahmen an dieser Studie teil, von denen 17 eine Resistenz gegen silberbasierte Therapeutika aufwiesen. Nach der Definition des endokrinen Ansprechens als einen stabilen Krankheitszustand über 6 Monate oder länger hinweg, betrug die gesamte Ansprechrate 50 %. Dies beinhaltete einen Fall vollständigen Ansprechens (3,8 %), zwei Fälle partiellen Ansprechens (7,7 %) und 10 Patientinnen mit stabilem Krankheitszustand (38,5 %) (Hasan, Ton et al. 2005).

Zusammengefaßt läßt sich feststellen, daß die *ESR1*-Amplifikation mit einem Vorkommen in ungefähr 2,1 % aller Ovarialkarzinome einen ungewöhnlichen Mechanismus zur Überexpression des Östrogenrezeptors beim Krebs des Ovars darstellt. Allgemein entspricht diese Häufigkeit dem Anteil an Ovarialkarzinomen, der nach den publizierten Daten vollständig auf eine Antiöstrogentherapie anspricht. Die starke prädiktive Aussagekraft der *ESR1*-Amplifikation für das Ansprechen auf eine Tamoxifen-Therapie bei Brustkrebs vorausgesetzt, erscheint eine Untersuchung solcher Therapien gerechtfertigt.

## 4.4 Technische Fragestellungen

Seit der Publikation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der *ESRI*-Amplifikation beim Mammakarzinom haben zehn andere Forschergruppen Daten diesbezüglich publiziert. Die gefundenen Amplifikationsraten bewegen sich zwischen 0 % und 22,6 % (siehe **Tabelle 16**, auch Kapitel 4.5). Hierbei sind verschiedene Techniken und Zählnormen zur Bestimmung der Kopiezahl der *ESRI*-Amplifikation angewendet worden. Mit allen Methoden wurden ähnlich diskrepante Ergebnisse ermittelt (siehe auch **Tabelle 16** und **Abbildung 48** bzw. **Abbildung 49**). Diese Daten lassen vermuten, daß sich die Detektion von *ESRI*-Amplifikationen schwieriger gestaltet als zunächst zu erwarten gewesen wäre. Daher sind methodische Fragestellungen offenbar die entscheidenden analytischen Ausgangspunkte, um eine Klärung der Frage nach der tatsächlichen *ESRI*-Amplifikationsrate zu erreichen.

### 4.4.1 Technische Herausforderungen bei der FISH-Analyse

Wie auch in Kapitel 4.5 weiter ausgeführt, erfordert die Zählung von *ESRI*-FISH-Signalen eine spezielle Sorgfalt. Die Signale müssen zuverlässig identifiziert und Artefakte entsprechend ausgeschlossen werden.

Die Methoden FISH oder CISH (Chromogenische In Situ Hybridisierung) weisen durch direkte Visualisierung in den Zellkernen die Anzahl der Genkopien in Gewebedünnschnitten unmittelbar nach. Kontaminierende Normalgewebszellen mit nicht erhöhter Kopiezahl stellen hier eine verhältnismäßig einfach vermeidbare Ursache für Analysefehler dar, da sie unter dem Mikroskop leicht von der Analyse auszuschließen sind. Daher ist es besonders auffällig, daß mit FISH und qPCR / MLPA ähnlich diskrepante Ergebnisse ermittelt und publiziert wurden, bei denen sich die Amplifikationsrate zwischen 2 % (Brown, Hoog et al. 2008; Vincent-Salomon, Raynal et al. 2008; Moelans, Monsuur et al. 2010) und über 20 % (Holst, Stahl et al. 2007; Tomita, Zhang et al. 2009; Tsiambas, Georgiannos et al. 2010) bzw. 16 - 20 % (Moelans, de Weger et al. 2010a; Moelans, de Weger et al. 2010b) bewegt (siehe **Tabelle 16**).

In den verschiedenen Studien wurden die selben Kriterien, also eine gegenüber der Anzahl der Signale des Zentromers 6 mindestens zweifach erhöhte Vermehrung des *ESRI*-Signals, zur Definition einer Genkopiezahlvermehrung als Amplifikation angewendet. Daher liegt es nahe, daß technische Fragestellungen, wie in Qualität und Machart verschiedene FISH-Sonden, Analysemethoden und FISH-Signalinterpretation für die unterschiedlichen Forschungsergebnisse verantwortlich sein müssen.

Die „Standardkriterien“ für die Definition von Genamplifikationen in der FISH-Auswertung wurden für die Detektion von *HER2*-Amplifikationen in Brustkrebs entwickelt.

Zu diesen gehören die erwähnte (Kapitel 2.3.7), durchschnittlich mindestens zweifach erhöhte Vermehrung der Anzahl des *ESR1*-Signals gegenüber der Anzahl der Signale des Zentromers 6 oder die Detektion von größeren Clustern von Gensignalen. Daher ist der Befund, daß sich *ESR1*-Amplifikationen und damit ihr Erscheinungsbild bei der FISH-Analyse größtenteils deutlich von *HER2*-Amplifikationen unterscheiden, von möglicherweise entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zu *HER2*-Amplifikation, bei denen typischerweise große Wolken traubenförmig angehäufter FISH-Signale auftreten, haben *ESR1*-amplifizierte Tumore normalerweise Cluster aus wenigen, eng beieinander liegenden FISH-Signalen.

Wie die FISH-Kartierung der *ESR1*-Amplifikationen in 24 entsprechenden Brusttumoren ergab (Kapitel 3.1.3), ist das Amplikon in ca. der Hälfte bis zu zwei Dritteln der Fälle ungefähr auf den Bereich der chromosomalen Sequenz (etwa 500 kb) von *ESR1* selbst beschränkt. Wenn die sich wiederholenden Abschnitte einer solchen intrachromosomalen Amplifikation vom HSR-Typ direkt aneinandergrenzen, ist daher zu erwarten, daß der Abstand zwischen den einzelnen FISH-Signalen eines Clusters sehr klein oder gar nicht sichtbar ist (siehe auch Kapitel 4.1.4). Dieser Effekt ist um so stärker, je größer die Sonde ist und maximal, wenn die Sonde die amplifizierte Sequenz vollständig umfaßt.

Die engen Signal-Cluster, die bei der FISH-Analyse auftreten, könnten also durch die relativ geringen Abstände der Bereiche bedingt sein, die durch eine ca. 200 kb lange oder längere FISH-Sonde abgedeckt werden. Solche Signalcluster können leicht als ein einziges Signal mißinterpretiert werden, wenn der Abstand zwischen diesen FISH-Signalen nicht mehr eindeutig auszumachen ist.

Während *HER2*-Amplifikationen typischerweise, in nahezu allen als *HER2*-amplifiziert eingestuften Geweben, aus Clustern mit Kopiezahlen von über 25 Genkopien in wenigstens einem Teil der Tumorzellen bestehen (Bartlett, Campbell et al. 2008) und in ca. 50 % der Fälle eine Ratio von über 6 aufweisen (Sauter, Lee et al. 2009a), treten *ESR1*-Amplifikationen normalerweise als kleine Cluster mit nicht mehr als 3 - 6 FISH-Signalen auf, die, wie beschrieben, häufig nahe beieinander liegen und dadurch u.U. schwer auseinanderzuhalten und zu zählen sind. Der Abstand zwischen den einzelnen FISH-Signalen ist oftmals kleiner als der Durchmesser eines FISH-Signals. Mitunter erscheinen diese daher als ein Cluster aus mehreren einzelnen ineinander übergehenden Signalen, die in einzelnen Fällen, wenn es sich um nur sehr wenige Kopiezahlen handelt, u.U. wie ein einziges FISH-Signal erscheinen (**Abbildung 6**).

Eine große FISH-Sonde, die in etwa das ganze Gen *ESR1* enthält, wird eher entsprechend konfluente Signale entstehen lassen, als eine kleinere FISH-Sonde, die nur einen kleineren Teil des Gens abdeckt. In der vorliegenden Arbeit wurde, zwecks größerer Auflösung und damit größerem Abstand zwischen den einzelnen Signalen, entsprechend eine verhältnismäßig kleine, selbst hergestellte Sonde (207 kb) verwendet.

Auch die Verwendung der Chromogenischen-In-Situ-Hybridisierung (CISH) anstelle der FISH-Analyse, könnte die Erkennung von solch kleinen Genclustern erschweren, da mit der CISH-Methode für gewöhnlich Signale eines größeren Signaldurchmessers erzeugt werden als mit der FISH-Methode. Zudem erschwert die bei der CISH-Methode angewandte definitorische Abgrenzung des Erscheinungsbildes der Signale zwischen dem Befund „amplifiziert“ und „nicht amplifiziert“ (mehr als fünf Gensignale oder das Auftreten von großen Clustern gelten als Kriterium für eine Amplifikation), welche ursprünglich für *HER2* festgelegt wurde, eine Erfassung von geringgradigen Kopiezahlvermehrungen, wie sie bei *ESR1* häufig sind.

So verwendeten Brown et al. (Brown, Hoog et al. 2008) die gleiche FISH-Sonde wie in der vorliegenden Arbeit (RP11- 450E249), ließen die Kopiezahlbestimmung allerdings durch ein automatisches Zählsystem durchführen, welches für die Erkennung von *HER2*-Amplifikationen entwickelt wurde und auf entsprechende Bedingungen abgestimmt ist.

In Anbetracht der kleinen und mitunter konfluenten *ESR1*-Cluster scheint es möglich, daß sich der Algorithmus, welcher für die Detektion von Amplifikationen vom Typ *HER2* entwickelt wurde, für die Erkennung der sich morphologisch vom *HER2*-Typ unterscheidenden *ESR1*-Amplifikationen nicht eignet.

Das *HER2*-Amplikon hingegen, dessen Cluster meist deutlich erkennbar sind, hat nach einer Studie aus dem Jahre 1997 eine Spanne von ungefähr 6000 - 10.000 kb und tritt als „high level“-Amplifikation auf (Barlund, Tirkkonen et al. 1997). Jedoch sind auch Untersuchungen publiziert (Tan, Lambros et al. 2008), die zeigen, daß das *HER2*-Amplikon ebenfalls sehr klein sein kann. Allerdings scheint dies seltener als bei *ESR1* der Fall zu sein. So beschreibt eine entsprechende Studie (Arriola, Marchio et al. 2008) innerhalb eines Kollektivs von 31 untersuchten, gemäß CISH-Analyse *HER2*-amplifizierten Fällen, nur einen *HER2*-amplifizierten Fall, bei dem das *HER2*-Amplikon weniger als 750 kb nämlich 746 kb umfaßt. Allerdings publizieren diese Autoren eine weitere Studie (Marchio, Natrajan et al. 2008), bei der in einer Serie von 26 *HER2*-amplifizierten Mammakarzinomen bei ungefähr der Hälfte der Fälle die Kartierung mittels aCGH das *HER2*-Amplikon auf einen ca. 400 kb großen Bereich eingrenzte. Allerdings kann mit der Methode der aCGH-Analyse nicht

festgestellt werden, in welcher Anordnung sich die amplifizierte Bereiche befinden, ob es sich also um einen HSR-Typ handelt, bei dem die Sequenzkopien hintereinander angeordnet sind. Aus einer jüngeren Studie (Staafl, Jonsson et al. 2010), in welcher 200 *HER2*-positive Karzinome untersucht wurden, geht hervor, daß das *HER2*-Amplikon in ca. 66 %, also ca. zwei Dritteln der Fälle, eine Ausdehnung von 850 kb deutlich überschreitet. Während demgegenüber nach der Kartierung bzgl. des Brustkarzinoms (Kapitel 3.1.3) ca. zwei Drittel der *ESR1*-Amplifikationen jedenfalls kleiner als mindestens ca. 600 kb sind (Ausdehnung entsprechend des Sequenzbereichs von Klon RP3-404G5 bis inkl. Klon P1-130E4) und 50 % sogar nur ca. 400 kb umfassen.

Diese Größenunterschiede zwischen *HER2*-Amplifikationen und *ESR1*-Amplifikationen können, vor allem im Zusammenhang mit den Unterschieden in der Kopiezahl der amplifizierten DNS-Sequenz, bei verwendeten FISH-Sonden von ca. 200 - 400 kb (siehe auch Kapitel 4.5 bzw. Tomita et al. (Tomita, Zhang et al. 2009)) einen entscheidenden Unterschied bei der Erscheinung von Signalclustern bei der FISH- und CISH-Analyse ausmachen.

Zudem handelt es sich nach der Studie von Staafl et al. (Staafl, Jonsson et al. 2010), nach der in der Publikation gegebenen Definition für die verwendete aCGH-Methode von einer  $\log_2$ -Ratio  $\geq 1$ , bei der überwiegenden Anzahl der *HER2*-Kopiezahlzugewinne um „high level“-Amplifikationen.

Daher ist es leicht vorstellbar, daß das Zusammentreffen von geringer Ausdehnung des Amplikons und geringer Kopiezahl besondere Schwierigkeiten bei der Auswertung verursachen kann, wogegen Amplifikationen von zwar geringer Kopiezahl, aber großer Ausdehnung und damit großem Signalabstand, sowie Amplifikationen geringer Ausdehnung aber hoher Kopiezahl, wie im Falle von *HER2*, entsprechend leichter feststellbar sind. So stellt also vermutlich die geringe Ausdehnung des *ESR1*-Amplikons, vor allem in der Kombination mit der geringen durchschnittlichen Kopiezahl der *ESR1*-Amplifikation, eine besonders auf *ESR1* zutreffende spezifische Eigenschaft dar, welche die Detektion der Amplifikation mit allen zur Verfügung stehenden Methoden erschwert.

In den Endometriumkarzinomen war dieses Phänomen noch stärker ausgeprägt als in Karzinomen der Brust. Dies macht es neben dem wahrscheinlichen Hauptgrund für die allgemein beschwerliche Detektion der *ESR1*-Amplifikation, der meist geringen Kopiezahl, beim Endometriumkarzinom vermutlich noch schwieriger, die *ESR1*-Amplifikationen zu identifizieren.

Obwohl auch der hochgerechnete Anteil an *ESR1*-Amplifikationen von ca. 6,5 %, welcher von Vang Nielsen et al. (Vang Nielsen, Ejlersen et al. 2011) bei Mammakarzinomen

publiziert und durch die Verwendung einer 380 kb großen Sonde ermittelt wurde, noch geringer ausfällt als der Anteil von ca. 8 - 10 % *ESRI*-Amplifikationen, welche sich aus der qPCR-Analyse der vorliegenden Arbeit ergeben, gibt es Hinweise, daß die tatsächliche *ESRI*-Amplifikationsrate deutlich höher ist.

So befinden sich die mit Hilfe der FISH-Analyse ermittelten Ergebnisse bzgl. der *ESRI*-Amplifikationsrate der vorliegenden Arbeit durchaus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen (siehe auch Kapitel 4.5). Tomita et al (Tomita, Zhang et al. 2009) publizierten eine mit einer ca. 400 kb großen kommerziellen FISH-Sonde (Zytovision) ermittelte Amplifikationsrate von 22 % in 133 Mammatumoren. Bemerkenswert ist, daß Tomita et al. die gleichen kleinen und bisweilen konfluenten Signal-Cluster beschreiben, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit analysiert und beschrieben wurden (siehe auch Kapitel 3.1 bzw. **Abbildung 6**). Tomita et al. führten eine digitale 3D-Bildanalyse durch, um die Anzahl der FISH-Signale zu bestimmen. Die Bildebenen wurden in 1,0 - 1,5 µm- Intervallen innerhalb der Gewebeschnitte aufgenommen und zur Kopiezahlbestimmung alle FISH-Signale in eine Bildebene projiziert. Die Autoren betonen in ihrer Arbeit, daß ohne diese Technik die Mehrheit der Amplifikationen, aufgrund der geringen Kopiezahl und geringen Größe der Cluster, unentdeckt geblieben wären.

Solche Überlegungen bzgl. verschiedener Auswerte- oder sogar der verschiedenen Hybridisierungstechniken selbst legen, wie von Vang Nielsen et al. (Vang Nielsen, Ejlertsen et al. 2011) vorgeschlagen, Ringversuche („interlaboratory studies“) nahe, in denen die Ergebnisse verschiedener Laboratorien bzgl. des Tumormaterials des selben Patientinnenkollektivs verglichen werden.

Aufgrund der jeweiligen Defizite der verschiedenen molekularbiologischen Methoden, ist es zudem grundsätzlich naheliegend, die mit einer Methode generierten Ergebnisse mit einer anderen unabhängigen Methode zu verifizieren. Daher wurden die entsprechend generierten Ergebnisse prinzipiell exemplarisch anhand einer weitgehend repräsentativen Auswahl von 14 gemäß FISH-Analyse *ESRI*-amplifizierter Mammatumore mit der qRT-PCR-Methode verifiziert, indem der statistisch signifikante Unterschied der qRT-PCR-Ratios der Gruppe der 14 gemäß FISH-Analyse *ESRI*-amplifizierter Mammatumore zu den Ratios der Kontrollgruppe der zehn nicht *ESRI*-amplifizierten Gewebe nachgewiesen wurde (Kapitel 3.1.5.1). Jeweils vier dieser qRT-PCR-Ergebnisse sind exemplarisch in der bereits erfolgten Publikation der Ergebnisse abgebildet (Holst, Stahl et al. 2007). Diese Daten sprechen dafür, daß es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit mit der FISH-Technik detektierten Phänomen um eine DNS-Kopiezahlvermehrung handelt.

Allerdings ist es auch möglich, daß bei der FISH-Methode Artefakte auftreten, die mit der Transkription eines Gens, durch offenes stark transkribiertes Chromatin entstehen könnten (Albertson 2008). So wäre die Hypothese möglich, daß sich in einem Teil der analysierten Fälle, beobachtete FISH-Signale partiell darauf zurückführen ließen, daß sich FISH-Sondenmaterial an sich im Zellkern befindliche Reste von prä-mRNS binden könnte (Xing, Johnson et al. 1995) oder durch das offene Chromatin selbst große diffuse oder gar gespaltene Gensignale verursacht werden.

Aufgrund der hohen Korrelation der FISH-Daten zur Expression auf Proteinebene (IHC) wären diese durch Transkriptionsvorgänge verursachten Artefakte zur Interpretation der Signale als Genamplifikation auf DNS-Ebene die einzige alternative Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten FISH-Signale.

Die nach der FISH-Kartierung (Kapitel 3.1.3) in 50 - 60 % der untersuchten Fälle festgestellte Beschränkung der *ESRI*-Amplifikationen auf die Ausdehnung des Gens *ESRI* scheint sogar gut mit einer Hybridisierung mit prä-mRNS-Molekülen und dem Auftreten von konfluenten, wölkchenartigen Signalen zusammenzupassen. Tatsächlich zeigen mit FISH nachgewiesene prä-mRNS-Ansammlungen an exprimierten Genen eine schweif- oder kranzartige Erscheinung an dem betreffenden Gen (Xing, Johnson et al. 1995; Melcak, Cermanova et al. 2000; Muhlemann, Mock-Casagrande et al. 2001). Jedoch konnte bei den Analysen der vorliegenden Arbeit stets ein ausreichender Anteil an Genclustern identifiziert werden, bei dem in den festgestellten Signalclustern eines Gewebes immer solche Cluster vorhanden waren, bei denen die einzelnen Gensignale insoweit separierbar waren, daß immer von einzelnen Genkopien ausgegangen werden kann. So kann davon ausgegangen werden, daß bei richtigen Hybridisierungsbedingungen immer Kopiezahlen feststell- oder zumindest schätzbar sind. Zudem konnte prä-mRNS nur in sehr frischem, direkt fixierten lebenden Zellmaterial nachgewiesen werden (Xing, Johnson et al. 1995; Jolly, Mongelard et al. 1997; Melcak, Cermanova et al. 2000; Muhlemann, Mock-Casagrande et al. 2001), so daß davon auszugehen ist, daß in formalinfixiertem Operationsmaterial keine ausreichenden Mengen an entsprechend gut erhaltener prä-mRNS erhalten sind, um einzelne Gensignale zu erzeugen, die durch eine hybridisierte FISH-Sonde vermittelt werden.

Zudem könnte selbst dieses Phänomen nicht die Diskrepanzen erklären, die bei den verschiedenen Publikationen von 0 % (Adelaide, Finetti et al. 2008) bis zu ca. 20 % Amplifikationen und ca. 10 % „gains“ reichen (Nessling, Richter et al. 2005; Holst, Stahl et al. 2007; Tomita, Zhang et al. 2009), da mindestens ein Drittel der in der vorliegenden Arbeit

gefundenen Amplifikationen über das Gen *ESR1* hinausgehend kartiert wurden und damit nicht lediglich auf *ESR1*-prä-mRNS zurückzuführen sein können.

Das im Zuge der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf Kopiezahlvermehrung untersuchte Gen des Progesteronrezeptors zeigte in der entsprechenden FISH-Analyse, bei vergleichbarer Auswertbarkeit, nur eine einzige *ESR1*-Kopiezahlvermehrung („gain“) bzw. ein entsprechendes Signalcluster. Da der Progesteronrezeptor bei Brustkrebs auf mRNA-Ebene in ähnlicher bzw. vergleichbarer Häufigkeit und Höhe exprimiert wird wie der Östrogenrezeptor (Roepman, Horlings et al. 2009; Schummer, Green et al. 2010), wären hier möglicherweise ebenfalls mehr prä-mRNS-Artefakte zu erwarten gewesen, sollte dieser Effekt bei *ESR1* zutreffen.

Noch deutlicher sollten solche prä-mRNS-Artefakte bei dem *ESR1*-5'-flankierenden Gen *C6orf97* auftreten, dessen Expression auch in der Intensität stark mit der Expression von *ESR1* korreliert ist (Yau, Fedele et al. 2007; Dunbier, Anderson et al. 2011; Sun, Asmann et al. 2011). Jedoch ergab die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Kartierung des *ESR1*-Amplikons bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde (pBAC-Klon RP11-282P11) keinen solchen Hinweis.

Das Ausbleiben eines solchen Effektes bei *PGR* und *C6orf97* spricht ebenfalls gegen das Vorkommen bei *ESR1*.

Zudem sind die *ESR1*-Amplifikationen bei 8 der 14 Proben, die mit der qPCR gegen die Referenzgene *ESR2* und *SOD2* untersucht wurden, auf *ESR1* beschränkt. Bei 6 der Proben ist die *ESR1*-Amplifikation auf der 5'-Seite oder beiden Seiten über *ESR1* hinausgehend amplifiziert. Weiter ist die *ESR1*-Amplifikation in den Fällen, die für die qPCR gegen das Referenzgen *ASXL2* verwendet worden sind, in 7 von 10 Fällen nachweisbar auf *ESR1* beschränkt. In den übrigen drei Proben (1A, 3A und 4A) war die FISH der 5' bzw. 3'-FISH-Sonden auf mindestens einer Seite nicht auswertbar.

Nach Ausschluß der Gewebe, deren *ESR1*-Amplifikation mindestens auf einer Seite über *ESR1* hinausgeht, oder deren FISH-Analyse mindestens auf einer Seite nicht auswertbar waren, wurde der statistische Unterschied beider Gruppen erneut berechnet. Das Ergebnis zeigt, daß die statistische Signifikanz des Unterschieds beider Gruppen erhalten bleibt.

Hierdurch konnte gezeigt werden, daß prä-mRNS-Artefakte die Ergebnisse der FISH-Analyse zumindest nicht allein erklären können. Vielmehr zeigen diese qRT-PCR-Ergebnisse eindeutig, daß hier erhöhte DNS-Kopiezahlen vorliegen.

In Anbetracht der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wie etwa der Reproduktion durch Tomita et al. (Tomita, Zhang et al. 2009) mit einer Amplifikationsrate

von 22,6 % (FISH) und der starken Assoziation zwischen *ESR1*-Kopiezahl und der ER-Proteinexpression (Holst, Stahl et al. 2007), zusammen mit den Ergebnissen von Nessling et al., die durch eine eindeutig DNS-spezifische Methode ermittelt wurden (aCGH) (Nessling, Richter et al. 2005) und der Verifizierung einer *ESR1*-spezifischen DNS-Kopiezahlvermehrung in repräsentativen Tumoren durch qPCR (inkl. solcher Fälle, in denen die Amplifikation auf *ESR1* beschränkt ist, siehe auch Kapitel 3.1.5) und dem Ausbleiben von FISH-Signalclustern bei vergleichbar transkribierten Genen (*PGR*, *C6orf97*), ist es naheliegend, daß es sich bei den als *ESR1*-Amplifikation beschriebenen kleinen Signalclustern, im wesentlichen Anteil der Fälle, weder um physikalische Artefakte noch um subjektive Zähl-Artefakte handelt.

Bzgl. der *ESR1*-Amplifikationsrate bei Mammakarzinomen (FISH) ist diesbezüglich auch die Arbeit von Tsiambas et al. mit 21,6 % interessant (Tsiambas, Georgiannos et al. 2010).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die derzeitige Datenlage bzgl. der *ESR1*-Amplifikation in Brustkrebs nahelegt, daß die Detektion von *ESR1*-Amplifikationen schwierig ist und die Berücksichtigung anderer methodischer Kriterien erfordert als die Detektion von *HER2*-Amplifikationen.

Die *HER2*-Amplifikation wird allgemein als ein Paradigma einer Genamplifikation angesehen und es scheint, als sei im allgemeinen die methodische Handhabung der Auswertung zur Detektion von Genamplifikationen lediglich an eine ausreichende Erkennung von Amplifikationen dieses Gens angepaßt. Insofern säen diese Unterschiede zwischen *ESR1*- und *HER2*-Amplifikationen Zweifel bzgl. der Anwendbarkeit der entsprechenden Handhabung für die Analyse von *ESR1*-Amplifikationen.

#### **4.4.2 Messung der *ESR1*-Kopiezahl mit qPCR**

Eine geringe Kopiezahl wirkt sich nicht nur erschwerend bei der Detektion von Genkopiezahlen mit der FISH-Methode, sondern zusätzlich auch ungünstig auf die Detektierbarkeit bei der aCGH bzw. Genchips und der qPCR aus (Kapitel 4.4.3).

Trotzdem konnte mit den der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden der FISH-Analyse, der qRT-PCR bzw. den Ergebnissen der Genchip-Analyse aus den vorangegangenen Arbeiten (Kapitel 1.5) dargelegt werden, daß es sich bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phänomen um eine *ESR1*-Sequenzvermehrung auf DNS-Ebene handelt.

Zunächst wurden für die qRT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit *ESR2* und *SOD2* als Referenzgene verwendet. Zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit

anderen Studien und der Reproduktion der Ergebnisse bzgl. eines alternativen Gewebekollektivs wurde in einem weiteren Ansatz mit anderen Proben zusätzlich zu *SOD2* auch das Gen *ASXL2* als Referenz gewählt. Die Ergebnisse bzgl. aller drei Referenzgene und beider Gewebekollektive zeigen in den DNS-Proben der Gewebe, die gemäß FISH-Analyse eine *ESR1*-Amplifikation tragen, im Vergleich zu den Kontrollproben ohne entsprechend festgestellte *ESR1*-Amplifikation gleichermaßen deutlich eine signifikant erhöhte Ratio von *ESR1* zu Referenzgen (Kapitel 3.1.5). Dies zeigt, daß nicht genetische Aberrationen bzgl. einzelner Referenzgene für erhöhte qRT-PCR-Ratios verantwortlich sind (Brown, Hoog et al. 2008; Reis-Filho, Drury et al. 2008).

Etwa durch frequente Deletionen des Referenzgens fälschlich als amplifiziert eingestuft Proben müßten zudem, bei gewöhnlicherweise einem deletierten Allel und über einen Normal-DNS-Standard normalisiert, eine 2-fach, also verhältnismäßig gering erhöhte Ratio der Kopiezahl aufweisen. Die selben Proben müßten gleichzeitig bei der Messung gegen andere Referenzgene wie *SOD2* eine normale Ratio von 1 ( $ESR1 / SOD2$ ) haben. Als mögliche Fälle kämen hierfür nur zwei der vierzehn Proben (ca. 14 %), nämlich Nummer 4 und 10, in Frage (für Ratio  $ESR1 / ESR2 > 1,5$  aber  $< 2,5$  und Ratio  $ESR1 / SOD2 > 0,5$  aber  $< 1,5$  und Ratio  $ESR1 / ESR2 - Ratio ESRI / SOD2 \geq 0,5$ ). Jedoch zeigen die Ergebnisse auch, daß bzgl. *ESR2* die Ratios durchschnittlich dreifach so hoch ausfallen wie bei *SOD2* (ebenso bei den Kontrollen).

Zudem müßten bei generell häufigem Auftreten von *ESR2*-Deletionen die Kontrollproben der Tumore, die gemäß FISH-Analyse eine normale *ESR1*-Kopiezahl aufweisen, ebenfalls prinzipiell *ESR2*-Deletionen aufweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen „FISH-amplifiziert“ und „nicht FISH-amplifiziert“ wäre so also nur dadurch zu erklären, daß sich *ESR2*-Deletionen zufälligerweise nur in der gemäß FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierten Gruppe häufen würden.

Hinzu kommt, daß die meisten (sieben von neun) der Proben, die bzgl. *ESR2* als Referenz durch deutliche erhöhte ( $> 3$ ) Ratios auffallen (Probe P1, P3, P5, P7, P9, P11, P12, P13, P14), auch bzgl. *SOD2* als Referenz eine verhältnismäßig stark (Ratio ca.  $\geq 1,5$ ) erhöhte Ratio aufweisen (Probe P1, P5, P7, P9, P11, P13, P14). Auch dadurch wird die Möglichkeit unwahrscheinlich, daß ein ausschlaggebendes Maß deutlich erhöhter Ratios ( $ESR1 /$  Referenzgen) lediglich durch Deletionen des einen bzw. anderen Referenzgens entstünde.

Auch ergeben sich keine Hinweise auf *ESR2*- oder *SOD2*-Deletionen in entsprechender Literatur (Chin, DeVries et al. 2006). Lediglich für Mammakarzinome des sogenannten

„basal-like“-Typs, welche als ER-negativ bekannt sind (Perou, Sorlie et al. 2000; Nielsen, Hsu et al. 2004), sind 14q-Deletionen beschrieben (Adelaide, Finetti et al. 2007).

Auch ergaben die FISH-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keinen Hinweis auf *ESR2*-Deletionen in den verwendeten Proben (Kapitel 3.4).

Zudem ist es unwahrscheinlich, daß gleich erscheinende clusterartige Amplifikationsmuster mit einzeln separierbaren Signalen in einem Fall eine durch qPCR validierbare echte Genamplifikation darstellen, in dem nicht durch qPCR validierbaren Fall mit gleichem Erscheinungsbild in der FISH-Analyse, jedoch ein Artefakt. Es ist daher unwahrscheinlich, daß sich die Gruppe der gemäß FISH-Analyse amplifizierten Proben nur aufgrund weniger „Ausreißer-Proben“ mit tatsächlich erhöhter Ratio der Kopiezahl (*ESR1* zu Referenzgen auf DNS-Ebene) durchschnittlich signifikant von der Gruppe der gemäß FISH-Analyse nicht amplifizierten Proben unterscheidet. Eine mögliche Erklärung für die schwierige Nachweisbarkeit der Amplifikation mit qRT-PCR wäre eine massive Kontamination mit Zellen, die keine *ESR1*-Amplifikation tragen (siehe Kapitel 4.4.3). Zu diesen Werten ist zudem festzustellen, daß diese gegen den Standard normalisiert sind. Betrachtet man die Ratios der in der FISH-Analyse als normal eingestuften Proben, so fällt auf, daß diese im Durchschnitt deutlich unter 1 liegen. Gegen das auf 1 gesetzte Mittel der in der FISH-Analyse als normal eingestuften Proben würden die Ratios der in der FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierten Proben auch in der Ratio *ESR1 / SOD2* deutlich höher liegen. Hier zeigt sich darin, daß für die Normalisierung auf nur eine und zudem käufliche Standard-Probe mit DNS-Material, das sich qualitativ von dem der Tumorproben stark unterscheidet, zurückgegriffen wurde, möglicherweise eine Schwäche des Experiments. Die Standardabweichung der CT-Werte der drei Triplikate des Standards lag bzgl. *SOD2* bei 0,24 Zyklen.

Bzgl. des Normalstandards scheint dadurch, daß die gegen *ESR2* gemessenen Ratios der Proben im Mittel tatsächlich deutlich höher ausfallen als die gegen *SOD2* gemessenen, die *ESR1*-Amplifikationsrate bei *ESR2* als Referenz wesentlich höher als bei *SOD2*. Jedoch ergibt die Analyse zwar deutlich höhere Ratios, aber im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine deutlich höhere Rate von Proben mit erhöhter Kopiezahl („Amplifikationsrate“). Lediglich 2 - 3 (Probe P2, P4 und P8) der 14 Proben (14 – 21 % der amplifizierten Proben) bewegen sich im Bereich des Durchschnitts der in der FISH-Untersuchung normal erscheinenden Proben. Sowohl die bzgl. *ESR2* als auch die bzgl. *SOD2* als Referenz gemessenen Ratios bei den in der FISH-Untersuchung nicht amplifiziert erscheinenden Proben (vor allem Probe P24) machen die Möglichkeit erwähnenswert, daß bei der mit Hilfe der Array-Technologie durchgeführten FISH-Analyse, aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden

Analysefläche des einzelnen „Gewebespots“, Amplifikationen übersehen worden sein könnten. Solche Fälle würden in der Kontrollgruppe der gemäß FISH-Analyse nicht amplifizierten Gewebe bei der qPCR-Analyse eine erhöhte Ratio zeigen, da im analysierten Gewebematerial *ESR1*-amplifizierte Zellkerne vorhanden wären. Aufgrund möglicher Heterogenität bei den in der FISH-Untersuchung als amplifiziert gewerteten Proben ist es, durch die gleichen Einschränkung der Array-Technologie, zudem möglich, daß für die qPCR-Methode weitgehend nicht oder weniger amplifiziertes Material untersucht worden ist. Bzgl. der Bewertung der Ergebnisse der qRT-PCR ist daher zu betonen, daß die Einteilung der Proben in „amplifiziert“ und „nicht amplifiziert“ durch die FISH-Technik erfolgte und anschließend die Untersuchung der beiden Gruppen mit der qRT-PCR-Technik durchgeführt wurde.

Betrachtet man, wie gut die relativen Ratios der Proben bzgl. des Referenzgens *ESR2* zueinander mit den Ratios bzgl. des Referenzgens *SOD2* bei den Normalkontrollen korrespondieren, so fällt auf, daß die absoluten Werte der Ratios bzgl. einer Probe bei beiden Referenzgenen sehr unterschiedlich, d. h. die Ratios bei *ESR2* deutlich höher ausfallen. Eine ähnliche Beobachtung ergibt sich bei *ASXL2* und *SOD2*. Dies unterstützt ebenfalls die Beobachtung, daß der absolute Wert der Ratio generell abhängig vom gewählten Referenzgen ist und nicht lediglich von den Mengenverhältnissen der jeweiligen DNS-Sequenzen einer bestimmten Probe.

#### **4.4.3 Technische Fragestellungen bei aCGH, Genchips und qPCR**

Die meisten Studien basierten methodisch auf „Array-CGH“ (aCGH) bzw. Genchips oder quantitativer PCR (qPCR), um *ESR1*-Amplifikationen nachzuweisen.

Alle drei Methoden haben den Nachteil, den die Analyse isolierter Tumor-DNS mit sich bringt. Unter optimalen Bedingungen, einschließlich hochqualitativer und reiner Tumor-DNS, haben sich diese Methoden auch zur Messung von geringen Genkopiezahländerungen bewährt.

Allerdings legen die widersprüchlichen Ergebnisse, die durch entsprechende Experimente generiert werden, nahe, daß in der Praxis die Sensitivität dieser Methode zum Nachweis von geringfügigen Genkopiezahländerungen limitiert sein könnte (siehe Kapitel 4.5).

So ist der Anteil an Tumorzellen in den Gewebeproben ein wichtiger Faktor, der die Ergebnisse dieser Methoden beeinflusst. Tumorgewebe enthält nahezu immer einen Anteil an nicht neoplastischen Zellen wie z.B. Brustepitel, Myoepitel, Stromazellen, Lymphozyten,

Fettgewebe, Blutgefäße und Nerven (Balkwill and Mantovani 2001; Coussens and Werb 2002) (siehe auch **Abbildung 45** und **Abbildung 46**).

Um das Risiko, hierdurch die Detektion einer geringgradigen Amplifikation zu verfehlen, kann eine Mikrodissektion des Gewebes durchgeführt werden, um so eine Gewebeprobe zu erhalten, die möglichst viele Tumorzellen enthält (Kapitel 2.4).

Ein Anteil an Tumorgewebe von 70 % wird allgemein als ausreichend für molekulargenetische Analysen von aus Tumoren isolierten Nukleinsäuren angesehen. Jedoch könnte im Falle von geringgradigem Kopiezahlzugewinn, wie bei *ESRI*, der Anteil von Tumorzellen ein besonders kritischer Parameter für den Erfolg oder Mißerfolg bei dem Nachweis von Amplifikationen in isolierter DNS darstellen. Bei aCGH-, Genchip- und qPCR-Experimenten werden Amplifikationen normalerweise als Ratio  $\geq 2,0$  zwischen der Genkopiezahl des betreffenden Testgens und der jeweiligen Referenz-DNS definiert. Bei einer Gewebeprobe mit einer angenommenen *ESRI*-Kopiezahl von 5 Kopien beliefe sich die Ratio auf 2,5 (5 *ESRI*-Kopien im Verhältnis zu 2 Referenzgenkopien), vorausgesetzt der Tumorzellanteil in der Gewebeprobe beträgt 100 %.

Im dem Fall, daß der Tumoranteil beispielsweise auf 70 % sinkt, fällt auch die Ratio Zielgen / Referenz auf 2,05. Dieser Wert liegt aber bereits nahe an der Definition für „nicht amplifiziert“. In geringgradig amplifizierten Fällen mit weniger als 70 % Tumorzellen, Aneuploidien des Chromosoms 6 oder Heterogenität der *ESRI*-Kopiezahlen innerhalb der Tumorzellpopulation (siehe **Abbildung 47**) kann die Ratio dann sogar unter die definitorische Grenze von 2,0 (für Amplifikationen) fallen und die qPCR-Analyse würde ein falsch negatives Ergebnis liefern (**Abbildung 45** und **Abbildung 46**).

Angenommen ein Gewebe mit geschätztem Tumoranteil von 70 % ist durch Kontamination mit Lymphozyten, Makrophagen oder Granulozyten tatsächlich mit bis zu 50 % durch Nicht-Tumorzellen durchsetzt, kann die Nachweisbarkeit von geringgradigen Kopiezahl erhöhungen vollständig fehlschlagen.

Wenn die etwa durch qPCR ermittelten Ratios von Test- zu Referenzgen bei der Auswertung der Rohdaten einmal normalisiert sind, sollte die Ratio von Geweben mit normaler bzw. nicht amplifizierter Kopiezahl (2 Testgenallele : 2 Referenzgenallele) 1 betragen. Die Ratio eines geringgradigen Kopiezahlzugewinns („gain“) von einer Kopie, entsprechend 3 Kopien pro Zellkern insgesamt, sollte 1,5 entsprechen. Unter Berücksichtigung von Kontaminationen mit nicht amplifizierten Zellen, wie z.B. infiltrierenden normalen Bindegewebszellen oder Immunzellen von bis zu 50 %, ist eine Ratio von 1,25 - 1,5 für einen „gain“ anzunehmen.

Schon durch ein geringes Hintergrundrauschen der qPCR von einer Ratio von 0,1 fällt die gesamte Ratio einer Probe schnell auf Werte von 1,15 und weniger. Damit sind solche Proben in der qPCR-Analyse nicht mehr von Geweben ohne erhöhte Kopiezahl oder Normalgeweben zu unterscheiden.

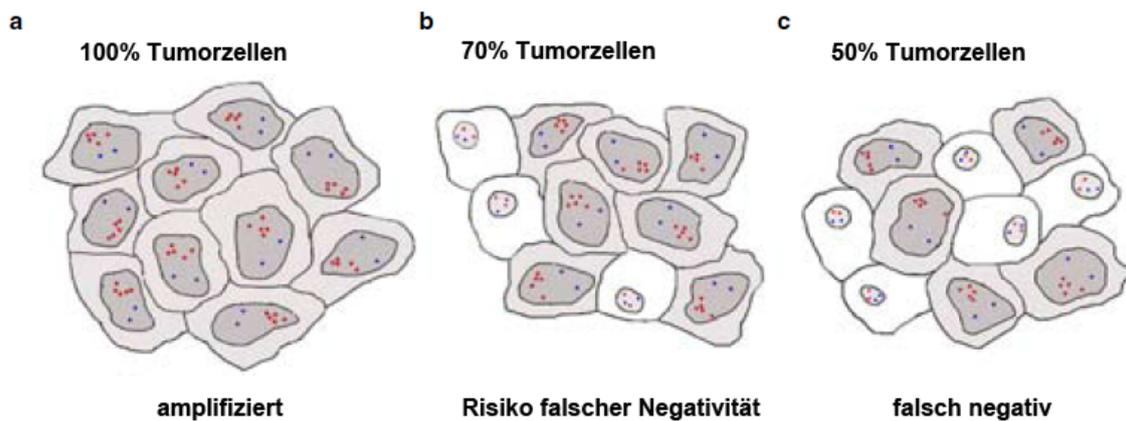
Ein Hindernis bei der Nachweisbarkeit von Amplifikationen mit qRT-PCR stellt also das Vorhandensein von Zellen ohne entsprechende Genamplifikation, wie etwa eine massive Kontamination des Tumorgewebes mit infiltrierendem Normalgewebiszellen oder Lymphozyten, dar.

Jedoch auch durch eine in der FISH-Analyse feststellbare mosaikartige Heterogenität bzgl. der *ESR1*-Kopiezahlen innerhalb des Tumors (Unterschiede von Zelle zu Zelle) könnte die entsprechende qPCR-Ratio so stark verringern, daß sie aus dem Hintergrundrauschen nicht mehr hervortritt. Unabhängig von anderen flexiblen Mechanismen allgemeiner genetischer Instabilität, welche in einem Tumor Genamplifikationen verschiedener Kopiezahl erzeugen könnten (Gisselsson, Pettersson et al. 2000), wäre vorstellbar, daß der BFB-Mechanismus in verschiedenen Zellen zu verschiedenen Kopiezahlen führt. Auch könnten, durch den molekulargenetischen Mechanismus der interchromosomalen homologen Rekombination vermittelt, sowohl biallelische Amplifikationen als auch solche unterschiedlicher Kopiezahl entstehen (Helleday 2003; Moynahan and Jasin 2010). Solche Heterogenität ist auch bei *HER2*-Amplifikationen bekannt (Szollosi, Balazs et al. 1995).

Sogar wenn augenscheinlich amplifizierte Tumorgewebe mit Kopiezahlen von bis zu fünf Kopien pro Zellkern bei gleichzeitiger Anwesenheit von zwei Chromosomen 6 auftreten, so sinkt die durchschnittliche Kopiezahl schnell auf drei oder sogar geringere Werte mit entsprechender Ratio von 1,5 oder weniger, wenn Tumorzellen mit geringerer Kopiezahl oder gar nur mit zwei Kopien im gleichen Tumor vorkommen. Bei einer erwähnten Kontamination mit Nicht-Tumorzellen von bis zu 50 % ergeben sich wiederum Ratios mit Werten um 1,25 entsprechend einem „gain“ und den entsprechenden, bereits erwähnten Konsequenzen für die Nachweisbarkeit. Vor allem auch in Anhängigkeit von der Sorgfalt mit der die Mikrodissektion durchgeführt wurde, kann dies daher auch mikrodisseziertes Tumormaterial betreffen.

Reis-Filho et al. (Reis-Filho, Drury et al. 2008) zeigten, daß eine weitere mögliche Fehlerquelle die Wahl der Referenz-DNS sein kann. In ihrer qRT-PCR-Analyse zeigten 11,4 % der untersuchten Tumore einen Kopiezahlzugewinn, wenn *ESR2* als Referenzgen gewählt wurde, während dies nur bei 2,8 % der Fall war, wenn *FAM38B* oder *ASXL2* als entsprechende Referenz gewählt wurden. Die geringfügige Veränderung der Kopiezahl des

Referenzgens, etwa der Deletion eines Allels, hat große Auswirkungen auf die qPCR-Ratio, da bei der normalerweise angenommenen Kopiezahl von zwei, eine Erhöhung oder Verringerung um eine Kopie schon eine Veränderung der Ratio um 50 % bedeutet. Auch die Effizienz des Assays des jeweiligen Referenzgens spielt dabei eine Rolle. Dies zeigen die unterschiedlichen hohen Ratios sowohl bei den gemäß FISH-Analyse amplifizierten als auch bei den nicht amplifizierten Proben.



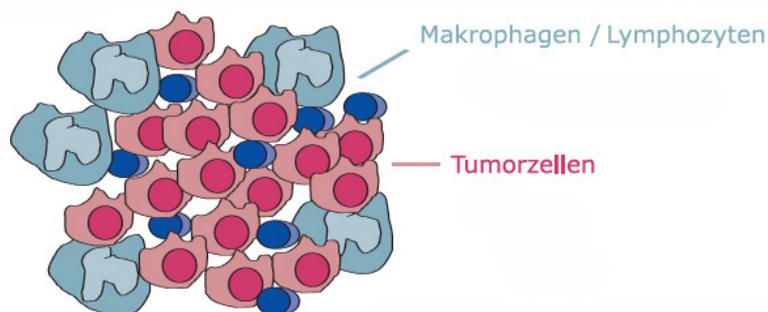
**Abbildung 45** Auswirkung von kontaminierenden Zellen ohne Genamplifikation in einem Tumor mit Genamplifikation geringer Kopiezahl auf die Verlässlichkeit der Nachweisbarkeit von Genkopiezahlerhöhungen mit qRT-PCR und aCGH bzw. Genchips. Die roten Punkte repräsentieren die Genkopien, die blauen Punkte die genomische Referenzregion in Form einer FISH-Visualisierung.

**a)** Genamplifikation (Ratio Gen / Referenz > 2.0) in 100 % Tumorzellen

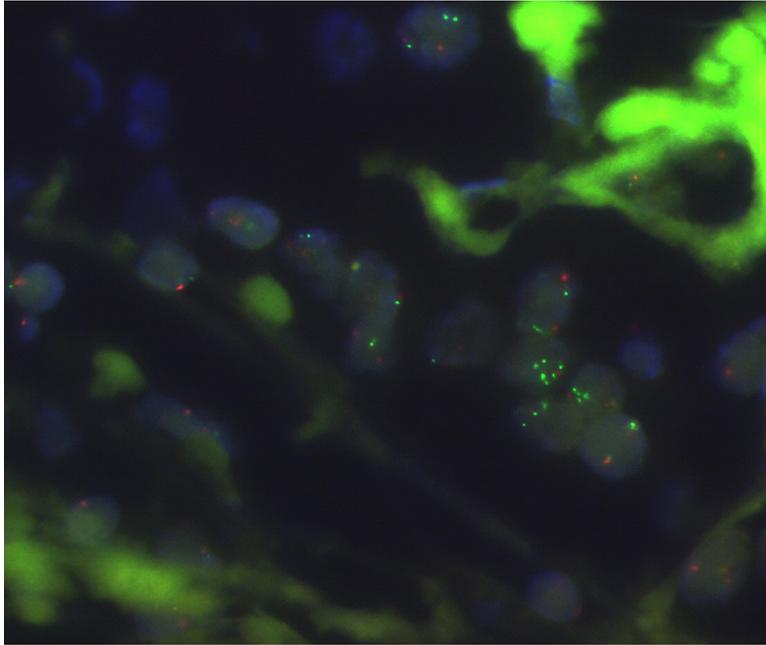
**b)** „Borderline“-Genmplifikation (Ratio Gen / Referenz  $\approx$  2.0) in 70 % Tumorzellen

**c)** Eine Genamplifikation ist nicht nachweisbar (Ratio Gen / Referenz < 2) in 50 % tumor cells.

Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit R. Simon und P Tennstedt (Holst, Simon et al. 2009).



**Abbildung 46** Schematische Darstellung der Infiltration von Tumorgewebe mit Immunzellen. Abbildung aus (Arends 2005), modifiziert.



**Abbildung 47** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100 $\times$ ) von Interphasezellkernen (blau) eines Brusttumorareals (blau) mit heterogener Verteilung der *ESR1*-Amplifizierten Tumorzellen. Nur wenige Zellen dieses Areals tragen eine erhöhte *ESR1*-Kopiezahl (grüne Signale) gegenüber dem Chromosoms 6 als Referenz (rot). Eigene Abbildung.

Für die vorliegende Arbeit wurden gemäß FISH-Analyse *ESR1* amplifizierte und entsprechend nicht amplifizierte Gewebe ohne vorherige Mikrodissektion bezüglich der Referenzgene *ESR2* und *SOD2* mit der qPCR-Methode analysiert (Kapitel 3.1.5.1). Zudem wurden 10 weitere gemäß FISH-Analyse *ESR1*-amplifizierte Gewebe und 10 weitere gemäß FISH-Analyse nicht amplifizierte Gewebe mit Hilfe der qPCR und *ASXL2* als Referenzgen untersucht (Kapitel 3.1.5.2). Wollte man mit Hilfe dieser kleinen Zahl von Gewebeproben den Anteil der gemäß qPCR amplifizierten Fälle (Ratio  $\geq 2,0$ ) innerhalb eines Kollektivs von gemäß FISH-Analyse amplifizierten Geweben überschlagen und extrapolierte entsprechend, ergäben sich 4 - 5 gemäß qPCR-Analyse amplifizierte Tumore innerhalb einer Gruppe von 10 Tumoren, welche gemäß FISH-Analyse eine *ESR1*-Amplifikation tragen. Das entspräche 40-50 %. Wiederum hochgerechnet auf die Amplifikationsrate der vorliegenden Arbeit von 20,6 % (gemäß FISH-Analyse), ergäbe sich hypothetisch eine durch qPCR bestätigte Amplifikationsrate von ca. 8-10 %. Ähnliche Werte bzgl. ermittelter *ESR1*-Amplifikationsraten ergaben die Analysen von Vang Nielsen et al. (Vang Nielsen, Ejlertsen et al. 2011) mit einem aus ER positiven und selektiv auf einen 55 %igen (50 von 91 Fällen) Anteil von früh rückfälligen Patientinnen zusammengestelltes Kollektiv von Mammatumoren. In diesem Kollektiv fanden Vang Nielsen et al. 14,3 % *ESR1* Amplifikationen. Berücksichtigt man eine durchschnittliche Rezidivierung von nur 15 % innerhalb der ersten fünf Jahre nach der chirurgischen Therapie (Paik, Shak et al. 2004; Kennecke, McArthur

et al. 2008) gegenüber den 55 % innerhalb von vier Jahren im Kollektiv von Vang Nielsen et al., und berücksichtigt weiter, daß 11 von 13 (85 %) der *ESRI*-amplifizierten Karzinome sich in der rezidierten Subgruppe befinden, verringert sich die von Vang Nielsen et al. ermittelte Amplifikationsrate auf etwa 9 % bzgl. einer normalverteilten ER-positiven Patientinnenpopulation. Entsprechend einem Anteil von etwa 75 % ER-positiver Mammakarzinome an der Gesamtheit der Mammakarzinome ergibt sich ein extrapoliertes Anteil von etwa 6,5 %.

Die experimentell ermittelten Amplifikationsraten anderer Arbeitsgruppen wie etwa der von Reis-Filho et al. (Reis-Filho, Drury et al. 2008), welche die „Array-CGH“-Methode mit mikrodisezierten Tumorzellen anwendeten, von 7,1 % geringgradiger Kopiezahlzugewinne (Ratio > 1 und < 2) und 4,3 % Amplifikationen bewegen sich noch in der gleichen Größenordnung. Währenddessen bewegen sich die Ergebnisse von Vincent-Salomon et al. (Vincent-Salomon, Raynal et al. 2008), welche ebenfalls die Genchip-Methode verwendeten und 0,9 % *ESRI*-Amplifikationen ermittelten, allerdings in einer vollständig anderen Dimension. Vincent-Salomon et al. machten zwar keine Angabe über eine möglicherweise durchgeführte Mikrodisektion, es scheint aber naheliegend, daß nur ein kleiner Anteil von Tumoren mit hochgradiger Kopiezahlvermehrung durch Genchips (aCGH) ohne weiteres nachzuweisen sind, wenn vor der DNS-Isolation keine Mikrodisektion Anwendung findet. Auch die Zusammenfassung der Ergebnisse von Genchip- bzw. aCGH-Studien, die van de Horlings et al. (Horlings, Bergamaschi et al. 2008) in ihrem Übersichtsartikel vorlegen, zeigt, daß selbst bei Amplifikationszielgenen wie beispielsweise *HER2*, bei welchem typischerweise ein hochgradiger Kopiezahlzugewinn vorliegt und daher eine verlässliche Nachweisbarkeit möglich sein sollte, erhebliche Schwankungen in den beschriebenen Amplifikationsraten der verschiedenen Forschergruppen auftreten, wobei sich die Unterschiede zwischen 7 % und 35 % bewegen. Diese Unterschiede ließen sich u.a. auch auf einen unterschiedlichen Gehalt an Tumorzellen in den verwendeten Gewebeproben der verschiedenen Arbeitsgruppen zurückführen.

## 4.5 *ESRI*-Amplifikationen in der Literatur

Kurz nach der Veröffentlichung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Jahr 2007 (Holst, Stahl et al. 2007) wurden Vorkommen und Bedeutung der *ESRI*-Amplifikation sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Endometriumkarzinom von zunächst fünf weiteren Forschergruppen untersucht. Diese Gruppen publizierten großenteils von den durch die vorliegende Arbeit ermittelten Resultaten deutlich abweichende Ergebnisse. Es konnte zwar die bloße Existenz der Amplifikation bestätigt werden, jedoch wurden hier in der Regel weitaus geringere Amplifikationsraten und in keiner Untersuchung eine Korrelation zur ER-Expression gefunden (Adelaide, Finetti et al. 2008; Brown, Hoog et al. 2008; Horlings, Bergamaschi et al. 2008; Reis-Filho, Drury et al. 2008; Vincent-Salomon, Raynal et al. 2008; Moelans, Monsuur et al. 2010).

Diese Analysen wurden mit den Methoden qPCR, aCGH (bzw. Genchips), FISH und CISH durchgeführt. Die Ursachen für die starken Abweichungen bei den Ergebnissen gegenüber den in der vorliegenden Arbeit durch die FISH-Methode ermittelten Ergebnissen, sind bei den Resultaten, die mit den Methoden qPCR und aCGH generiert wurden, wahrscheinlich auch hier durch eine Heterogenität der Brustkrebszellen, bzw. durch eine Kontamination durch Zellen aus normalen Brustgewebe, wie u.a. auch durch Lymphozyten bedingt, die diese Genkopiezahlvermehrungen nicht tragen. Da mit den Methoden qPCR und aCGH der Durchschnitt der in der untersuchten Probe enthaltenen Genkopiezahlen untersucht wird, ergibt sich so im Vergleich zu den Zellen, aufgrund derer ein Gewebe als amplifiziert eingestuft wurde, eine starke Verminderung der gemessenen Kopiezahl bzw. Ratio (siehe auch Kapitel 4.4.2).

Die methodischen Schwierigkeiten, die sich bei der Identifizierung von *ESRI*-Amplifikationen ergeben, werden auch dadurch demonstriert, daß die erwähnten Arbeitsgruppen nicht nur zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sondern auch zu- bzw. untereinander widersprüchlichen Daten ermitteln und publizieren. Selbst innerhalb der einzelnen Gruppen werden, oft abhängig von der Methode, Amplifikationsraten veröffentlicht, die bis um das Zehnfache von einander abweichen. So veröffentlichte beispielsweise Horlings et al. Ergebnisse verschiedener aCGH-Studien mit Amplifikationsraten von 1 % (untersuchte Proben: n = 148) bis hin zu 10 % (untersuchte Proben: n = 31), während Reis-Filho et al. mit aCGH (untersuchte Proben: n = 70) 11,4 % erhöhte Kopiezahl (4,3 % Amplifikationen und 7,1 % „gains“) jedoch mit qPCR (untersuchte Proben: n = 35) und *FAM38B* oder *ASXL2* als Referenzgen lediglich 2,8 % ermittelten

(Tabelle 16). Die *ESRI*-Amplifikation war allerdings vor der Publikation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in der Literatur nicht völlig unbekannt.

Fünf Studien, die *ESRI*-Amplifikationen im Mammakarzinom zum Gegenstand haben, wurden vor der ersten Publikation (Holst, Stahl et al. 2007) von Teilen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veröffentlicht.

1990 wurde die erste Arbeit publiziert, in der die Existenz und Detektion von *ESRI*-Amplifikationen beschrieben wurde (Nembrot, Quintana et al. 1990). Mit Hilfe des „Southern Blot“-Verfahrens (einer DNS-spezifische Methode, siehe auch Kapitel 1.4.1) ermittelten Nembrot et al. in 6 von 14 (42 %) ER-positiven Mammatumoren eine geringgradige („low level“) *ESRI*-Amplifikation. Auf einen allgemeinen Anteil der ER-positiven Tumore bei Mammakarzinomen von etwa 75 % hochgerechnet, entspricht dies einer Rate erhöhter *ESRI*-Kopiezahlen von etwa 30 %. In den acht untersuchten ER-negativen Tumoren wurde dagegen keine erhöhte Kopiezahl gefunden. Allerdings konnten Nembrot et al., möglicherweise aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten, keine Korrelation von *ESRI*-Amplifikation und ER-Expression nachweisen. Dies trug möglicherweise mit dazu bei, daß der Arbeit die angemessene Aufmerksamkeit versagte wurde. Jedoch zogen Nembrot et al. auch hieraus den vermutlich richtigen Schluß, daß nämlich das Maß der ER-Expression komplexeren Mechanismen als einer monokausalen Ursache unterliegen muß.

Ein weiterer Grund, der mit dazu beigetragen haben mag, daß die Ergebnisse von Nembrot et al. keine entsprechende wissenschaftliche Resonanz fanden, ist möglicherweise auch die zwei Jahre später erschienene Arbeit von Watts et al. (Watts, Handel et al. 1992). Diese Arbeitsgruppe fand mit der gleichen Methode wie Nembrot et al. eine Amplifikationsrate von nur 2,7 % bei einer Fallzahl von 37 Mammakarzinomen (10 ER-negativ und 17 ER-positiv).

Im Jahre 2000 wurde eine weitere Arbeit veröffentlicht, in der ebenfalls *ESRI*-Amplifikationen gefunden wurden. Nessling et al. (Nessling, Richter et al. 2005) fanden mit einem DNS-spezifischen Verfahren, in diesem Falle mittels der „BAC-Array-CGH“-Methode, in 8 von 31 Mammakarzinomen eine Kopiezahlerhöhung (26 %). In 3 Fällen (etwa 10 %) hatte diese Erhöhung das Niveau einer Amplifikation (Kopiezahlerhöhung  $> 2$ ). Nach der Definition der vorliegenden Arbeit für eine Amplifikation (Kopiezahlerhöhung  $\geq 2$ ) ergäbe sich mit den Daten von Nessling et al. für 6 Fälle eine Amplifikation (19 %) und in zwei Fällen (6,5 %) ein geringgradiger Kopiezahlgewinn („gain“).

Veröffentlichungen, die den Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gleichkommen, bzw. diese bestätigen, erschienen nicht nur vor, sondern ebenfalls auch nach der Publikation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. So konnte die japanische Arbeitsgruppe Tomita et al.

(Tomita, Zhang et al. 2009) die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der *ESRI*-Amplifikation, inkl. der Korrelation zur ER-Expression und der prädiktiven Relevanz, weitgehend bestätigen.

Mit Hilfe der FISH-Methode ermittelte die Gruppe in 133 Mammatumoren eine Amplifikationsrate von 22,6 % und einen zusätzlichen Anteil an „gains“ von 11,3 %.

Die statistische Analyse ergab ebenfalls ein besseres Ansprechen der *ESRI*-amplifizierten Tumore gegenüber den nicht *ESRI*-amplifizierten Tumoren. Dieser Trend hatte jedoch keine statistische Signifikanz. Tomita et al. benutzten für ihre FISH-Analysen eine spezielle 3D-Bildanalysetechnik, so daß auch die in einer nur zweidimensionalen Bildanalyse unscharf oder gar nicht erscheinenden FISH-Signale gezählt werden konnten. So stellten Tomita et al. in ihrer Arbeit fest, daß ohne eine solche sorgfältige dreidimensionale Analyse die Amplifikationsrate lediglich 13,5 % ergeben hätte. Dies illustriert, daß der Nachweis der *ESRI*-Amplifikation mit allen zur Verfügung stehenden Methoden besondere Schwierigkeiten birgt.

Zwei weitere Arbeiten aus dem Jahre 2010 (Tsiambas, Georgiannos et al. 2010; Vang Nielsen, Ejlersen et al. 2011) bestätigen diese Schwierigkeiten. Während Tsiambas et al. in 60 Mammakarzinomen 21,6 % Amplifikationen ermittelten, konnte die Arbeitsgruppe Vang Nielsen et al. in 94 ER-positiven Mammatumoren einer „case-control“-Studie aus rezidierten und nicht rezidierten Fällen nur 13 *ESRI*-amplifizierte Fälle identifizieren. Das entspricht, wie erwähnt, bei einem Anteil der ER-positiven Tumoren an der Gesamtheit der Mammatumoren von ca. 75 % und einer natürlichen Rückfallrate von 15% einer hochgerechneten Amplifikationsrate von ca. 6,5 %.

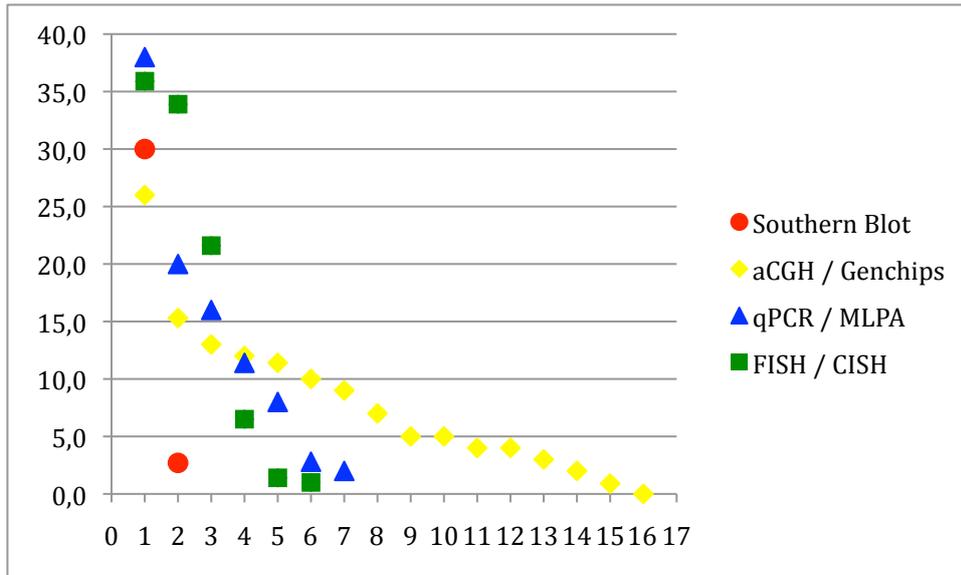
Auch die Arbeitsgruppe Moelans et al. veröffentlichte noch im selben Jahr (2010), nachdem mit einem auf die Detektion von *HER2*-Amplifikationen ausgerichteten Ansatz eine *ESRI*-Amplifikationsrate von 2 % (und 6 % „gains“) bei n = 135 untersuchten Geweben ermittelt wurde, bzgl. der PCR basierten MLPA-Technik weitere Ergebnisse. Mit modifizierter Methode, nämlich der Verwendung eines anders zusammengesetzten „Kits“, bei dem die Zusammensetzung der verschiedenen MLPA-Sonden variiert wurde und der Analyse anderer Gewebekollektive, konnten nun in 16 % (untersuchte Gewebe: n = 104), bzw. 20 % (untersuchte Gewebe: n = 39) der Gewebe eine erhöhte *ESRI*-Kopiezahl nachgewiesen werden (Moelans, de Weger et al. 2010a; Moelans, de Weger et al. 2010b). Im Jahre 2011 wurde eine weitere aCGH-Untersuchung veröffentlicht, mit der in 44 ER-positiven Tumoren eine Amplifikation und acht geringgradige Kopiezahlzugewinne gefunden wurden (Dunbier, Anderson et al. 2011). Das entspricht einem Gesamtanteil an Kopiezahl erhöhungen von 20 %.

Hochgerechnet auf einen Anteil der ER-positiven Mammakarzinome von ca. 75 % an der Gesamtheit der Mammakarzinome entspricht dies einem Anteil mit erhöhter *ESRI*-Kopiezahl von etwa 15 %, was der Hälfte der mit der vorliegenden Arbeit ermittelten durchschnittlichen Rate an Kopiezahlerhöhungen entspricht.

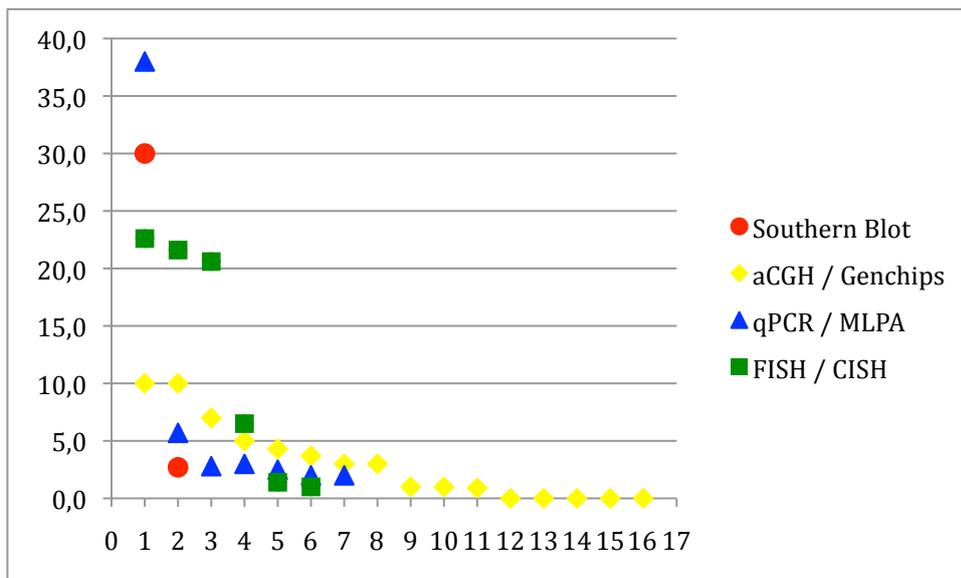
Die meist geringe, auf das Gen *ESRI* selbst beschränkte Größe und die ebenfalls geringe Kopiezahlerhöhung, machten es vermutlich schwierig, die *ESRI*-Amplifikation schon früher mit klassischen CGH-Untersuchungen zu entdecken. Bei der in den Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten DNS-SNP-Chipanalyse wurde das *ESRI*-Amplikon in mindestens zwei von 22 Fällen gefunden. In beiden Fällen beschränkte sich der Bereich einer gemessenen Kopiezahlerhöhung entweder vollständig oder zumindest im Teilbereich des größten gemessenen Kopiezahzugewinns auf die sieben in der *ESRI*-Sequenz liegenden SNPs und einen 5'-flankierenden SNP im Bereich der Sequenz des *C6orf97* (siehe **Abbildung 17**). In beiden Fällen bewegte sich dieser aber auf geringgradigem Niveau (drei bzw. vier *ESRI*-Kopien). Aufgrund eines stets vorhandenen „Hintergrundrauschens“, welches sich durchaus im Bereich der Amplitude einer Kopie oder sogar einiger weniger Kopien bewegen kann, sind solche „low level“-Zugewinne dieser geringen Ausdehnung, auch mit höher auflösenden CGH-Arrays bzw. Genchips, schwierig von kurzen Artefakten zu unterscheiden. Hierdurch wird die Identifizierung solcher Amplifikationen durch diese Technologie entsprechend erschwert.

Die in der Literatur publizierten Amplifikationsraten weichen also größtenteils stark voneinander ab und bewegen sich zwischen 0 % und 22,6 % (siehe **Tabelle 16**, auch Kapitel 4.4.1). Dies ist bei allen verwendeten Methoden der Fall. Diese Verhältnisse können damit durchaus an andere, frühere Situationen in der Brustkrebsforschung erinnern. Vang Nielsen et al. stellten dazu fest, daß diese Diskrepanzen die frühen Tage der *HER2*-Diagnostik widerspiegeln, als verschiedene Patientenpopulationen, Methoden, Zählrichtlinien und Toleranzgrenzen (engl.: „cut off“) zu intensiven Diskussionen geführt haben, bis robuste Richtlinien etabliert wurden (Vang Nielsen, Ejlersen et al. 2011).

Eine Übersicht über die von unterschiedlichen Forschergruppen und mit verschiedenen angewandten Methoden ermittelten unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. der *ESRI*-Amplifikationsraten ist im Anhang in **Tabelle 16** (Brustkrebs) und **Tabelle 17** (Krebs des Endometriums und des Ovars) zusammengestellt. Eine entsprechende graphische Übersicht bzgl. Brustkrebs ist in **Abbildung 48** und **Abbildung 49** dargestellt.



**Abbildung 48** Graphische Übersicht über die verschiedenen, in der Literatur publizierten Raten von erhöhten *ESRI*-Kopiezahlen (Amplifikation + „gain“) beim Mammakarzinom (nach Methoden farblich unterschieden). Y-Achse: Amplifikationsraten in %. X-Achse: Zahl der Studien nach Größe der Rate absteigend geordnet. Detaillierte Darstellung mit Literaturangaben im Anhang in **Tabelle 16**. Eigene Abbildung.



**Abbildung 49** Graphische Übersicht über die verschiedenen, in der Literatur publizierten *ESRI*-Amplifikationsraten (nur Amplifikationen ohne „gain“) beim Mammakarzinom (nach Methoden farblich unterschieden). Y-Achse: Amplifikationsraten in %. X-Achse: Zahl der Studien nach Größe der Rate absteigend geordnet. Detaillierte Darstellung mit Literaturangaben im Anhang in **Tabelle 16**. Eigene Abbildung.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie, deren zunächst abschließender Teil diese Arbeit ist, war es, bisher unbekannte Genamplifikationen beim Mammakarzinom mit klinischer Relevanz zu finden. Dieses Ziel scheint erreicht. Es wurden eindeutige Hinweise für eine bisher in diesem Umfang und vor allem auch in dieser klinischen Bedeutung unbekannte Genamplifikation gefunden. Hierbei handelt es sich um die Amplifikation von *ESRI*, des Gens für den Östrogenrezeptor. Somit wurde mit der vorliegenden Arbeit ein möglicher neuer Biomarker entdeckt, welcher bei der Brustkrebstherapie von Bedeutung sein könnte.

Hierzu wurde methodisch in einem mehrstufigen Ansatz aus DNS-Genchip-Analyse (Vorarbeiten) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf „Tissue microarrays“ (TMAs) vorgegangen. Das hierfür verwendete Gewebekollektiv bestand aus einigen gutartigen und präkanzerösen Mammaläsionen und über 2000 Mammakarzinomen mit zugehörigen klinischen Folgedaten.

Die FISH-Analyse der TMAs mit einer *ESRI*-spezifischen Sonde ergab in 20,6 % der auswertbaren Fälle eine Amplifikation und in weiteren 15 % der Fälle ein „gain“ von *ESRI*.

Der Vergleich der Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit denen der immunhistologischen Auswertung des TMAs bzgl. des Östrogenrezeptors (ER) ergab sowohl für die Tumore mit einer *ESRI*-Amplifikation als auch für die Tumore mit „gains“ eine deutliche Assoziation mit einer hohen ER-Expression (7-8 nach Allred) und einem hohen Differenzierungsgrad (G1) ( $p < 0,0001$ ).

Ein weiterer ungewöhnlicher Befund war, daß die *ESRI*-Amplifikation ebenfalls in gutartigen und präkanzerösen Läsionen des Mammagewebes wie etwa Hyperplasien, Papillomen, DCIS und LCIS gefunden werden konnte.

Bzgl. des für das Projekt entscheidenden Kriteriums der klinischen Relevanz wurde ein wichtiger Hinweis gefunden. Innerhalb der Gruppe von Patientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten, wiesen diejenigen Tumorpasientinnen, bei denen im Tumorgewebe eine *ESRI*-Amplifikation nachgewiesen werden konnte, ein signifikant längeres Überleben auf als die Patientinnen, die zwar eine ER-Expression aufwiesen, aber keine *ESRI*-Amplifikation zeigten.

Diese Korrelation war unabhängig vom pathologischen Grad, Tumorstadium und Nodalstatus der Tumore.

Bemerkenswerterweise beschränkte sich die Amplifikation in einem Testkollektiv in der Hälfte bis zu zwei Dritteln der Fälle auf das Gen *ESRI*, während es in ca. einem Drittel der Fälle, in stark variierendem Maße, Bereiche entweder in der 3′-, der 5′-Richtung oder auf

beiden Seiten über das Gen selbst hinaus umfaßte. Daraus ergibt sich, daß neben der geringen Erhöhung der Kopiezahl das Amplikon in der Regel auch sehr klein und auf das *ESRI* Gen beschränkt ist.

Diese Befunde werfen die Frage nach dem Entstehungsmechanismus auf, der zu einem frühen Auftreten der *ESRI*-Amplifikation mit geringer Kopiezahl führt.

Vor allem diese bei der *ESRI*-Amplifikation für gewöhnlich geringe Kopiezahlerhöhung dürfte eine besondere Herausforderung für alle Detektionsmethoden darstellen, bei denen die Methoden besonders betroffen sind, welche die durchschnittliche Ratio der Genkopiezahlen extrahierter DNS-Proben messen.

Nachdem die *ESRI*-Amplifikation beim Mammakarzinom nachgewiesen werden konnte, lag es nahe, andere gynäkologische Tumore, speziell die so häufigen Entitäten, wie das Endometriumkarzinom und das Ovarialkarzinom, auf diese Aberration hin zu untersuchen. Hierfür wurde ebenfalls die TMA-Technologie eingesetzt. Die Amplifikationsrate lag beim Endometriumkarzinom ähnlich hoch wie beim Mammakarzinom (22,7 % Amplifikationen, 5,7 % „gains“) und konnte auch in 25,6 % der untersuchten Hyperplasien gefunden werden.

Der Vergleich der Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit denen der immunhistologischen Auswertung des TMAs bzgl. des Östrogenrezeptors (ER) ergab beim Endometriumkarzinom, ähnlich den Verhältnissen beim Mammakarzinom, sowohl für die Tumore mit einer *ESRI*-Amplifikation als auch für die Tumore mit „gains“ eine deutliche Assoziation mit einer hohen ER-Expression (5 - 8 nach Allred) ( $p < 0,0036$ ). Hinweise auf eine klinische Relevanz der *ESRI*-Amplifikation beim Endometriumkarzinom konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden.

Bei den ebenfalls mit Hilfe der TMA-Technologie untersuchten Ovarialkarzinomen kommt die *ESRI*-Amplifikation im Gegensatz zum Mamma- und Endometriumkarzinom nur selten vor (2,1 %). Eine klinische Relevanz ist hier ebenfalls unklar.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, daß die *ESRI*-Amplifikation eine im Mamma- und Endometriumkarzinom im bedeutendem Ausmaß vorkommende genetische Abberation ist, während diese im Ovarialkarzinom sehr selten auftritt.

Im Gegensatz zu den deutlichen Hinweisen auf eine klinische Relevanz beim Mammakarzinom, konnten diese beim Endometriumkarzinom nicht gefunden werden.

Dies entspricht hier der Bedeutung der ER-Expression, die beim Endometriumkarzinom eine uneindeutige, komplexe und bisher schlecht verstandene Rolle spielt.

Beim Mammakarzinom könnte mit Hilfe des Nachweises der *ESRI*-Amplifikation, für entsprechend definierte Gruppen von Patientinnen, eine bessere Vorhersage bzgl. des

Ansprechens auf eine Anti-ER- bzw. Antiöstrogentherapie gemacht werden. So könnten bei den Patientinnen mit ER-positiven Karzinomen diejenigen identifiziert werden, welche besser bzw. vergleichsweise schlechter von einer solchen Therapie profitieren. Dadurch könnten möglicherweise zusätzliche Therapien und die entsprechenden Nebenwirkungen reduziert werden.

Vor allem die hochsignifikante Korrelation zur ER-Expression und die Verifizierung der Amplifikationen durch die DNS-spezifische qRT-PCR-Methode, lassen für diese Arbeit den Schluß zu, daß es sich um tatsächliche *ESR1*-Amplifikationen auf DNS-Ebene handelt.

Gleichzeitig machen die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen internationalen Forschergruppen bzgl. der *ESR1*-Amplifikationsrate und der klinischen Bedeutung der *ESR1*-Amplifikation deutlich, daß ihre Detektion schwierig ist und diesbezüglich einheitliche methodische Richtlinien zur Detektion und Analyse entwickelt werden müssen. Zudem sind weitere Untersuchungen notwendig, um die entsprechenden Fragestellungen, wie die der klinischen Relevanz, eindeutig zu klären.

## 6 Kooperationen

Die Arbeiten bzgl. der FISH-Validierung der Genchip-Daten und die FISH-Auswertung des Prognose- und Progressionsarrays wurden von mir und unter meiner direkten Anleitung und Betreuung gemeinsam mit dem damaligen Medizinstudenten Phillip Stahl durchgeführt, welcher diese Ergebnisse in seiner Dissertation dargestellt hat (Stahl 2009). Entsprechend erfolgte die Zusammenarbeit mit der damaligen Medizinstudentin Niloufar Seyedi-Fazlollahi, welche die Ergebnisse bzgl. der *ESRI*-Amplifikation beim Endometriumkarzinom für ihre Dissertation aufgearbeitet hat (Seyedi-Fazlollahi 2010). Die statistische Berechnung der entsprechenden Daten des Prognose- und Progressionsarrays bzgl. der klinischen Relevanz und Epidemiologie erfolgte mit Hilfe von PD Dr. rer. nat. Ronald Simon.

Die Arbeiten für die FISH-Auswertung des „Mapping-TMA“ zur Kartierung des *ESRI*-Amplikons (siehe Kapitel 3.1.3.2) wurden unter meiner direkten Anleitung und Betreuung des damaligen Studenten der Zahnmedizin Marc Wendland durchgeführt, welcher diese Ergebnisse wiederum in seiner Dissertation dargestellt hat (Wendland 2009).

Alle Arbeiten zur Durchführung der qPCR wurde von mir selbst ausgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe und Beratung von Dr. rer. nat. Olaf Hellwinkel und PD Dr. rer. nat. Ronald Simon.

Die Lasermikrodissektion wurde von der Assistenzärztin des Instituts für Pathologie der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Ana-Maria-Dancau, durchgeführt.

Die Durchführung der Immunhistochemischen Arbeiten erfolgte durch die technische Assistenz des Instituts für Pathologie der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und die entsprechende Auswertung durch die Pathologen Prof. Dr. med. Guido Sauter (Mamma), PD Dr. med. Annette Lebeau, Dr. med. Dr. rer. nat. Tobias Grob (Endometrium) und Dr. med. Rana Issa (Ovar) des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, sowie dem niedergelassenen Facharzt für Pathologie, Dr. med. Andreas Turzynski (Endometrium).

Vorarbeiten bzgl. der verwendeten TMAs bzw. die entsprechenden pathologischen Arbeiten sind in Kapitel. 2.1 beschrieben.

Die im Rahmen der Zusammenarbeit mit den von mir methodisch-wissenschaftlich angeleiteten und von PD Dr. rer. nat. Ronald Simon betreuten Doktoranden des Fachbereichs Medizin, bzw. Zahnmedizin Phillip Stahl, Marc Wendland und Niloufar Seyedi-Fazlollahi generierten Ergebnisse, die in ihre jeweiligen medizinischen Dissertationen eingingen, wurden mit den jeweiligen Beteiligten gemeinsam ausgewertet und diskutiert.

## 7 Literaturverzeichnis

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.

WHO (2009). "World Health Statistic 2009." World Health Organization (WHO) (Hrsg). Genf.

Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-917.

Garcia, M., Jemal, A., Ward, E.M., Center, M.M., Hao, Y., Siegel, R.L., Thun, M.J. (2007). "Global Cancer Facts & Figures 2007." American Cancer Society. Atlanta, GA.

Breckwoldt, M., M. Kaufmann and A. Pfleiderer (2008). "Gynäkologie und Geburtshilfe." 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme.

Allred, D. C. and P. E. Swanson (2000). "Testing for erbB-2 by immunohistochemistry in breast cancer." Am J Clin Pathol **113**(2): 171-5.

Allred, D. C., S. K. Mohsin and S. A. Fuqua (2001). "Histological and biological evolution of human premalignant breast disease." Endocr Relat Cancer **8**(1): 47-61.

Kreienberg, R., I. Kopp, U. Albert, H. H. Bartsch, M. W. Beckmann, D. Berg, U. Bick, A. du Bois, W. Budach, J. Dunst, J. Engel, B. Ernst, M. Geraedts, U. Henschler, D. Hölzel, C. Jackisch, K. König, H. Kreipe, T. Kühn, A. Lebeau, S. Leinung, H. Link, H.-J. Lück, H. Madjar, A. Maiwald, G. Maiwald, N. Marschner, M. Marx, G. von Minckwitz, I. Naß-Griegoleit, K. Possinger, A. Reiter, W. Sauerbrei, W. Schlake, R. Schmutzler, I. Schreer, H. Schulte, K.-D. Schulz, R. Souchon, C. Thomssen, M. Untch, U. Wagner, J. Weis and T. Ziemler (2008). "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms." 1. Aktualisierung 2008, München: W. Zuckschwerdt.

Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet and P. Boyle (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol **18**(3): 581-92.

Kurman, R. J., Ed. (2002). Blaustein's pathology of the female genital tract. New York, Springer.

Silverberg, S. G., R. J. Kurman, F. Nogales, G. L. Mutter, R. A. Kubik-Huch and F. A. Tavassoli (2003). "Tumours of the uterine corpus: Epithelial tumors and related lesions." F. A. Tavassoli and P. Devilee, Eds.) Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, 221-249.

Bergeron, C., A. Ferenczy, D. O. Toft and G. Shyamala (1988). "Immunocytochemical study of progesterone receptors in hyperplastic and neoplastic endometrial tissues." Cancer Res **48**(21): 6132-6.

Thigpen, T., M. F. Brady, H. D. Homesley, J. T. Soper and J. Bell (2001). "Tamoxifen in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study." J Clin Oncol **19**(2): 364-7.

Jeon, Y. T., I. A. Park, Y. B. Kim, J. W. Kim, N. H. Park, S. B. Kang, H. P. Lee and Y. S. Song (2006). "Steroid receptor expressions in endometrial cancer: clinical significance and epidemiological implication." Cancer Lett **239**(2): 198-204.

Leidenberger, F., Strowitzki, T, Ortmann, O (2009). "Klinische Endokrinologie für Frauenärzte " 4. Auflage, Berlin: Springer.

DKG (2010). "Interdisziplinäre Leitlinie Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms." Deutsche Krebsgesellschaft (DKG)(Hrsg), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)(Hrsg), Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (AGO)(Hrsg). München: W. Zuckschwerdt.

Smyth, J. F., C. Gourley, G. Walker, M. J. MacKean, A. Stevenson, A. R. Williams, A. A. Nafussi, T. Rye, R. Rye, M. Stewart, J. McCurdy, M. Mano, N. Reed, T. McMahon, P. Vasey, H. Gabra and S. P. Langdon (2007). "Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients." Clin Cancer Res **13**(12): 3617-22.

Coleman, W. B. and G. J. Tsongalis, Eds. (2001). The Molecular Basis of Human Cancer. Totowa, Humana Press.

Cho, K. R. and B. Vogelstein (1992). "Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence." Cancer **70**(6 Suppl): 1727-31.

Goyette, M. C., K. Cho, C. L. Fasching, D. B. Levy, K. W. Kinzler, C. Paraskeva, B. Vogelstein and E. J. Stanbridge (1992). "Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer." Mol Cell Biol **12**(3): 1387-95.

Alberts, B. (1997). "Molekularbiologie der Zelle." korrigierter Nachdruck der 3. Auflage, Weinheim: VCH, 1489-1531.

Moreno-Bueno, G., S. Rodriguez-Perales, C. Sanchez-Estevéz, D. Hardisson, D. Sarrio, J. Prat, J. C. Cigudosa, X. Matias-Guiu and J. Palacios (2003). "Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer." Oncogene **22**(38): 6115-8.

Elsheikh, S., A. R. Green, M. A. Aleskandarany, M. Grainge, C. E. Paish, M. B. Lambros, J. S. Reis-Filho and I. O. Ellis (2008). "CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome." Breast Cancer Res Treat **109**(2): 325-35.

Oliner, J. D., K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George and B. Vogelstein (1992). "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas." Nature **358**(6381): 80-3.

Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." Nature **362**(6423): 857-60.

Zhang, X. P., F. Liu and W. Wang (2011). "Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): 8990-5.

Butturini, A. and R. P. Gale (1990). "Oncogenes and leukemia." Leukemia **4**(2): 138-60.

- Kramer, M. H., J. Hermans, E. Wijburg, K. Philippo, E. Geelen, J. H. van Krieken, D. de Jong, E. Maartense, E. Schuurin and P. M. Kluin (1998). "Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma." Blood **92**(9): 3152-62.
- Rong, S., M. Oskarsson, D. Faletto, I. Tsarfaty, J. H. Resau, T. Nakamura, E. Rosen, R. F. Hopkins, 3rd and G. F. Vande Woude (1993). "Tumorigenesis induced by coexpression of human hepatocyte growth factor and the human met protooncogene leads to high levels of expression of the ligand and receptor." Cell Growth Differ **4**(7): 563-9.
- Jeffers, M., S. Rong and G. F. Woude (1996). "Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis." J Mol Med **74**(9): 505-13.
- Chiara, F., P. Michieli, L. Pugliese and P. M. Comoglio (2003). "Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity." J Biol Chem **278**(31): 29352-8.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**(4785): 177-82.
- Mischel, P. S., R. Shai, T. Shi, S. Horvath, K. V. Lu, G. Choe, D. Seligson, T. J. Kremen, A. Palotie, L. M. Liau, T. F. Cloughesy and S. F. Nelson (2003). "Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling." Oncogene **22**(15): 2361-73.
- Shinojima, N., K. Tada, S. Shiraishi, T. Kamiryo, M. Kochi, H. Nakamura, K. Makino, H. Saya, H. Hirano, J. Kuratsu, K. Oka, Y. Ishimaru and Y. Ushio (2003). "Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme." Cancer Res **63**(20): 6962-70.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.
- Stiewe, T. (2007). "The p53 family in differentiation and tumorigenesis." Nat Rev Cancer **7**(3): 165-8.
- Albertson, D. G. (2006). "Gene amplification in cancer." Trends Genet **22**(8): 447-55.
- Pedram, A., M. Razandi, M. Aitkenhead, C. C. Hughes and E. R. Levin (2002). "Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology." J Biol Chem **277**(52): 50768-75.
- Korach, K. S., Migiaccio, S., Davis, V.L. (1996). "Estrogens." P. L. Munson, Mueller, R.A., Breese, G.R., (Ed. Principles of Pharmacology: Basic Concepts and Clinical Applications. New York: Chapman and Hall, 809-825.
- Katzenellenbogen, B. S. (1996). "Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways." Biol Reprod **54**(2): 287-93.
- Parker, M. G., N. Arbuckle, S. Dauvois, P. Danielian and R. White (1993). "Structure and function of the estrogen receptor." Ann N Y Acad Sci **684**: 119-26.
- Omoto, Y., H. Eguchi, Y. Yamamoto-Yamaguchi and S. Hayashi (2003). "Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7." Oncogene **22**(32): 5011-20.

- Ignatov, A., T. Ignatov, A. Roessner, S. D. Costa and T. Kalinski (2010). "Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells." Breast Cancer Res Treat **123**(1): 87-96.
- Marsigliante, S., A. Muscella, V. Ciardo, J. R. Puddefoot, G. Leo, G. P. Vinson and C. Storelli (1995). "Multiple isoforms of the oestrogen receptor in endometrial cancer." J Mol Endocrinol **14**(3): 365-74.
- Brandenberger, A. W., D. I. Lebovic, M. K. Tee, I. P. Ryan, J. F. Tseng, R. B. Jaffe and R. N. Taylor (1999). "Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells." Mol Hum Reprod **5**(7): 651-5.
- Hanstein, B., M. W. Beckmann and H. G. Bender (2002). "Role of estrogen receptor isoforms in the pathogenesis and treatment of endometrial cancer." Zentralbl Gynakol **124**(1): 17-9.
- Freiss, G., C. Prebois and F. Vignon (1993). "William L. McGuire Memorial Symposium. Control of breast cancer cell growth by steroids and growth factors: interactions and mechanisms." Breast Cancer Res Treat **27**(1-2): 57-68.
- Martin, M. B., M. Saceda and R. K. Lindsey (1993). "Regulation of estrogen receptor expression in breast cancer." Adv Exp Med Biol **330**: 143-53.
- Miyoshi, Y., K. Murase, M. Saito, M. Imamura and K. Oh (2010). "Mechanisms of estrogen receptor-alpha upregulation in breast cancers." Med Mol Morphol **43**(4): 193-6.
- Beatson, G. (1896). "On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases." Lancet (2): 104-7.
- Lacassagne, A. (1932). "Apparition de cancers de la mamelle chez la souris mâle, soumise à des injections de folliculine." C. R. Acad. Sci.(195): 630-2.
- Stierer, M., H. Rosen, R. Weber, H. Hanak, J. Spona and H. Tuschler (1993). "Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors." Ann Surg **218**(1): 13-21.
- Sunderland, M. C. and C. K. Osborne (1991). "Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review." J Clin Oncol **9**(7): 1283-97.
- Andersen, J. and H. S. Poulsen (1989). "Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer." Cancer **64**(9): 1901-8.
- Ferguson, S. E., R. A. Soslow, A. Amsterdam and R. R. Barakat (2006). "Comparison of uterine malignancies that develop during and following tamoxifen therapy." Gynecol Oncol **101**(2): 322-6.
- Dorssers, L. C., S. Van der Flier, A. Brinkman, T. van Agthoven, J. Veldscholte, E. M. Berns, J. G. Klijn, L. V. Beex and J. A. Foekens (2001). "Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms." Drugs **61**(12): 1721-33.
- Hozumi, Y., K. Suemasu, H. Takei, T. Aihara, M. Takehara, T. Saito, S. Ohsumi, N. Masuda and Y. Ohashi (2011). "The effect of exemestane, anastrozole, and tamoxifen on lipid profiles

in Japanese postmenopausal early breast cancer patients: final results of National Surgical Adjuvant Study BC 04, the TEAM Japan sub-study." Ann Oncol **22**(8): 1777-82.

Llombart-Cussac, A., A. Ruiz, A. Anton, A. Barnadas, S. Antolin, J. E. Ales-Martinez, I. Alvarez, R. Andres, J. A. Garcia Saenz, J. Lao, E. Carrasco, C. Camara, I. Casas and M. Martin (2011). "Exemestane versus anastrozole as front-line endocrine therapy in postmenopausal patients with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: Final results from the Spanish Breast Cancer Group 2001-03 phase 2 randomized trial." Cancer: [Epub 2011/05/10].

Vogel, V. G. (2011). "Selective Estrogen Receptor Modulators and Aromatase Inhibitors for Breast Cancer Chemoprevention." Curr Drug Targets.

Wolmark, N. and B. K. Dunn (2001). "The role of tamoxifen in breast cancer prevention: issues sparked by the NSABP Breast Cancer Prevention Trial (P-1)." Ann N Y Acad Sci **949**: 99-108.

ACOG (2006). "ACOG committee opinion. No. 336: Tamoxifen and uterine cancer." Obstet Gynecol **107**(6): 1475-8.

Teufel, G., H. Geyer, G. de Gregorio, A. Fuchs, W. Kleine and A. Pfeleiderer (1983). "[Estrogen and progesterone receptors in malignant ovarian neoplasms]." Geburtshilfe Frauenheilkd **43**(12): 732-40.

Kommoss, F., J. Pfisterer, M. Thome, W. Schafer, W. Sauerbrei and A. Pfeleiderer (1992). "Steroid receptors in ovarian carcinoma: immunohistochemical determination may lead to new aspects." Gynecol Oncol **47**(3): 317-22.

Cardillo, M. R., E. Petrangeli, N. Aliotta, L. Salvatori, L. Ravenna, C. Chang and G. Castagna (1998). "Androgen receptors in ovarian tumors: correlation with oestrogen and progesterone receptors in an immunohistochemical and semiquantitative image analysis study." J Exp Clin Cancer Res **17**(2): 231-7.

van Doorn, H. C., C. W. Burger, P. van der Valk and H. M. Bonfrer (2000). "Oestrogen, progesterone, and androgen receptors in ovarian neoplasia: correlation between immunohistochemical and biochemical receptor analyses." J Clin Pathol **53**(3): 201-5.

Lindgren, P., T. Backstrom, C. G. Mahlck, M. Ridderheim and S. Cajander (2001). "Steroid receptors and hormones in relation to cell proliferation and apoptosis in poorly differentiated epithelial ovarian tumors." Int J Oncol **19**(1): 31-8.

Vang, R., B. P. Whitaker, A. I. Farhood, E. G. Silva, J. Y. Ro and M. T. Deavers (2001). "Immunohistochemical analysis of clear cell carcinoma of the gynecologic tract." Int J Gynecol Pathol **20**(3): 252-9.

Lindgren, P. R., S. Cajander, T. Backstrom, J. A. Gustafsson, S. Makela and J. I. Olofsson (2004). "Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors." Mol Cell Endocrinol **221**(1-2): 97-104.

Rosen, D. G., X. Huang, M. T. Deavers, A. Malpica, E. G. Silva and J. Liu (2004). "Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma." Mod Pathol **17**(7): 790-7.

- Van Mieghem, T., V. M. Abeler, P. Moerman, L. Verbist, I. Vergote and F. Amant (2005). "CD10, estrogen and progesterone receptor expression in ovarian adenosarcoma." Gynecol Oncol **99**(2): 493-6.
- Vang, R., A. M. Gown, T. S. Barry, D. T. Wheeler and B. M. Ronnett (2006). "Immunohistochemistry for estrogen and progesterone receptors in the distinction of primary and metastatic mucinous tumors in the ovary: an analysis of 124 cases." Mod Pathol **19**(1): 97-105.
- De Sousa Damiao, R., C. T. Fujiyama Oshima, J. N. Stavale and W. J. Goncalves (2007). "Analysis of the expression of estrogen receptor, progesterone receptor and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I in ovarian epithelial cancers and normal ovaries." Oncol Rep **18**(1): 25-32.
- Farinola, M. A., A. M. Gown, K. Judson, B. M. Ronnett, T. S. Barry, S. Movahedi-Lankarani and R. Vang (2007). "Estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression in ovarian adult granulosa cell tumors and Sertoli-Leydig cell tumors." Int J Gynecol Pathol **26**(4): 375-82.
- Hogdall, E. V., L. Christensen, C. K. Hogdall, J. Blaakaer, S. Gayther, I. J. Jacobs, I. J. Christensen and S. K. Kjaer (2007). "Prognostic value of estrogen receptor and progesterone receptor tumor expression in Danish ovarian cancer patients: from the 'MALOVA' ovarian cancer study." Oncol Rep **18**(5): 1051-9.
- Langdon, S. P., A. J. Crew, A. A. Ritchie, M. Muir, A. Wakeling, J. F. Smyth and W. R. Miller (1994). "Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens in vitro and in a xenograft model." Eur J Cancer **30A**(5): 682-6.
- Clinton, G. M. and W. Hua (1997). "Estrogen action in human ovarian cancer." Crit Rev Oncol Hematol **25**(1): 1-9.
- Makar, A. P. (2000). "Hormone therapy in epithelial ovarian cancer." Endocr Relat Cancer **7**(2): 85-93.
- Cunat, S., P. Hoffmann and P. Pujol (2004). "Estrogens and epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol **94**(1): 25-32.
- Perry, G. H., N. J. Dominy, K. G. Claw, A. S. Lee, H. Fiegler, R. Redon, J. Werner, F. A. Villanea, J. L. Mountain, R. Misra, N. P. Carter, C. Lee and A. C. Stone (2007). "Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation." Nat Genet **39**(10): 1256-60.
- Crone, S. A., Y. Y. Zhao, L. Fan, Y. Gu, S. Minamisawa, Y. Liu, K. L. Peterson, J. Chen, R. Kahn, G. Condorelli, J. Ross, Jr., K. R. Chien and K. F. Lee (2002). "ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy." Nat Med **8**(5): 459-65.
- Garratt, A. N., C. Ozcelik and C. Birchmeier (2003). "ErbB2 pathways in heart and neural diseases." Trends Cardiovasc Med **13**(2): 80-6.
- Rubin, I. and Y. Yarden (2001). "The basic biology of HER2." Ann Oncol **12 Suppl 1**: S3-8.
- Pellegrini, C., M. Falleni, A. Marchetti, B. Cassani, M. Miozzo, F. Buttitta, M. Roncalli, G. Coggi and S. Bosari (2003). "HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a

comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry." Clin Cancer Res **9**(10 Pt 1): 3645-52.

Risio, M., G. De Rosa, I. Sarotto, L. Casorzo, L. Capussotti, B. Torchio, M. Aglietta and L. Chiecchio (2003). "HER2 testing in gastric cancer: molecular morphology and storage time-related changes in archival samples." Int J Oncol **23**(5): 1381-7.

Marx, A. H., E. C. Burandt, M. Choschzick, R. Simon, E. Yekebas, J. T. Kaifi, M. Mirlacher, D. Atanackovic, C. Bokemeyer, W. Fiedler, L. Terracciano, G. Sauter and J. R. Izbicki (2011). "Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers." Hum Pathol **41**(11): 1577-85.

Mayr, D., V. Kanitz, B. Anderegg, B. Luthardt, J. Engel, U. Lohrs, G. Amann and J. Diebold (2006). "Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays." Am J Clin Pathol **126**(1): 101-9.

Cornolti, G., M. Ungari, M. L. Morassi, F. Facchetti, E. Rossi, D. Lombardi and P. Nicolai (2007). "Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **133**(10): 1031-6.

Pauletti, G., W. Godolphin, M. F. Press and D. J. Slamon (1996). "Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization." Oncogene **13**(1): 63-72.

Pegram, M. and D. Slamon (2000). "Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy." Semin Oncol **27**(5 Suppl 9): 13-9.

Pegram, M. D., A. Lipton, D. F. Hayes, B. L. Weber, J. M. Baselga, D. Tripathy, D. Baly, S. A. Baughman, T. Twaddell, J. A. Glaspy and D. J. Slamon (1998). "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." J Clin Oncol **16**(8): 2659-71.

Albanell, J. and J. Baselga (1999). "Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer." Drugs Today (Barc) **35**(12): 931-46.

Visscher, D. W., T. Wallis, S. Awussah, A. Mohamed and J. D. Crissman (1997). "Evaluation of MYC and chromosome 8 copy number in breast carcinoma by interphase cytogenetics." Genes Chromosomes Cancer **18**(1): 1-7.

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): 8534-40.

Anzick, S. L., J. Kononen, R. L. Walker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X. Y. Guan, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, J. M. Trent and P. S. Meltzer (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." Science **277**(5328): 965-8.

- Simpson, J. F., D. E. Quan, F. O'Malley, T. Odom-Maryon and P. E. Clarke (1997). "Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast." Am J Pathol **151**(1): 161-8.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinanen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola and O. P. Kallioniemi (1995). "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer." Nat Genet **9**(4): 401-6.
- Koivisto, P., T. Visakorpi and O. P. Kallioniemi (1996). "Androgen receptor gene amplification: a novel molecular mechanism for endocrine therapy resistance in human prostate cancer." Scand J Clin Lab Invest Suppl **226**: 57-63.
- Koivisto, P., J. Kononen, C. Palmberg, T. Tammela, E. Hyytinen, J. Isola, J. Trapman, K. Cleutjens, A. Noordzij, T. Visakorpi and O. P. Kallioniemi (1997). "Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer." Cancer Res **57**(2): 314-9.
- Koivisto, P., M. Kolmer, T. Visakorpi and O. P. Kallioniemi (1998). "Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer." Am J Pathol **152**(1): 1-9.
- Bubendorf, L., M. Kolmer, J. Kononen, P. Koivisto, S. Mousses, Y. Chen, E. Mahlamaki, P. Schraml, H. Moch, N. Willi, A. G. Elkahloun, T. G. Pretlow, T. C. Gasser, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi (1999). "Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays." J Natl Cancer Inst **91**(20): 1758-64.
- Bates, M., J. Sperinde, W. J. Kostler, S. M. Ali, K. Leitzel, E. M. Fuchs, A. Paquet, Y. Lie, T. Sherwood, R. Horvat, C. F. Singer, J. Winslow, J. M. Weidler, W. Huang and A. Lipton (2011). "Identification of a subpopulation of metastatic breast cancer patients with very high HER2 expression levels and possible resistance to trastuzumab." Ann Oncol **22**(9): 2014-20.
- Brodeur, G. M. (1992). "Biological and clinical significance of MYCN amplification in human neuroblastomas." R. E. Kellems, (Ed. Gene Amplification in Mammalian Cells: A Comprehensive Guide New York: Marcel Dekker Inc., 383-395.
- MacLeod, R. A. F., Nagel, S. (2005) "E2F3 (E2F transcription factor 3)." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, **July 2005**, URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/E2F3ID40384ch6p22.html>
- Kuttler, F. and S. Mai (2007). "Formation of non-random extrachromosomal elements during development, differentiation and oncogenesis." Semin Cancer Biol **17**(1): 56-64.
- Gisselsson, D., L. Pettersson, M. Hoglund, M. Heidenblad, L. Gorunova, J. Wiegant, F. Mertens, P. Dal Cin, F. Mitelman and N. Mandahl (2000). "Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5357-62.
- Anderson, G. R. (2001). "Genomic instability in cancer." Current Science **Vol. 81, No. 5**.
- Charames, G. S. and B. Bapat (2003). "Genomic instability and cancer." Curr Mol Med **3**(7): 589-96.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.

- Beckman, R. A. and L. A. Loeb (2005). "Genetic instability in cancer: theory and experiment." Semin Cancer Biol **15**(6): 423-35.
- Thompson, S. L., S. F. Bakhoun and D. A. Compton (2010). "Mechanisms of chromosomal instability." Curr Biol **20**(6): R285-95.
- Hastings, P. J., G. Ira and J. R. Lupski (2009). "A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation." PLoS Genet **5**(1): e1000327.
- Hastings, P. J., J. R. Lupski, S. M. Rosenberg and G. Ira (2009). "Mechanisms of change in gene copy number." Nat Rev Genet **10**(8): 551-64.
- Helleday, T. (2003). "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells." Mutat Res **532**(1-2): 103-15.
- Moynahan, M. E. and M. Jasin (2010). "Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 196-207.
- McVean, G. (2010). "What drives recombination hotspots to repeat DNA in humans?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1544): 1213-8.
- Barlow, J. H. and R. Rothstein (2010). "Timing is everything: cell cycle control of Rad52." Cell Div **5**: 7.
- Gisselsson, D., T. Jonson, A. Petersen, B. Strombeck, P. Dal Cin, M. Hoglund, F. Mitelman, F. Mertens and N. Mandahl (2001). "Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12683-8.
- 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): 531-8.
- Narayanan, V., P. A. Mieczkowski, H. M. Kim, T. D. Petes and K. S. Lobachev (2006). "The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks." Cell **125**(7): 1283-96.
- Narayanan, V. and K. S. Lobachev (2007). "Intrachromosomal gene amplification triggered by hairpin-capped breaks requires homologous recombination and is independent of nonhomologous end-joining." Cell Cycle **6**(15): 1814-8.
- Osheim, Y. N., O. L. Miller, Jr. and A. L. Beyer (1988). "Visualization of *Drosophila melanogaster* chorion genes undergoing amplification." Mol Cell Biol **8**(7): 2811-21.
- Claycomb, J. M., M. Benasutti, G. Bosco, D. D. Fenger and T. L. Orr-Weaver (2004). "Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*." Dev Cell **6**(1): 145-55.
- Tower, J. (2004). "Developmental gene amplification and origin regulation." Annu Rev Genet **38**: 273-304.

- Claycomb, J. M. and T. L. Orr-Weaver (2005). "Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression." Trends Genet **21**(3): 149-62.
- Calvi, B. R., B. A. Byrnes and A. J. Kolpakas (2007). "Conservation of epigenetic regulation, ORC binding and developmental timing of DNA replication origins in the genus *Drosophila*." Genetics **177**(3): 1291-301.
- Stark, G. R. and G. M. Wahl (1984). "Gene amplification." Annu Rev Biochem **53**: 447-91.
- Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto and G. M. Wahl (1989). "Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification." Cell **57**(6): 901-8.
- Syu, L. J. and M. M. Fluck (1997). "Site-specific in situ amplification of the integrated polyomavirus genome: a case for a context-specific over-replication model of gene amplification." J Mol Biol **271**(1): 76-99.
- Vogt, N., S. H. Lefevre, F. Apiou, A. M. Dutrillaux, A. Cor, P. Leuraud, M. F. Poupon, B. Dutrillaux, M. Debatisse and B. Malfoy (2004). "Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11368-73.
- Knippers, R. (2001). "Molekulare Genetik." Thieme Verlag **9. Auflage**: S. 204.
- Collins, S. and M. Groudine (1982). "Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line." Nature **298**(5875): 679-81.
- Alitalo, K., M. Schwab, C. C. Lin, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1983). "Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(6): 1707-11.
- Schwab, M., K. Alitalo, K. H. Klempnauer, H. E. Varmus, J. M. Bishop, F. Gilbert, G. Brodeur, M. Goldstein and J. Trent (1983). "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour." Nature **305**(5931): 245-8.
- Schwab, M. (1994). "Human neuroblastoma: amplification of the N-myc oncogene and loss of a putative cancer-preventing gene on chromosome 1p." Recent Results Cancer Res **135**: 7-16.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Han, H. S., J. S. Kim, J. H. Park, Y. K. Jeon, K. W. Lee, D. Y. Oh, J. H. Kim, S. Y. Park, S. A. Im, T. Y. Kim, I. A. Park and Y. J. Bang (2009). "Weekly paclitaxel and trastuzumab as a first-line therapy in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer: magnitude of HER2/neu amplification as a predictive factor for efficacy." J Korean Med Sci **24**(5): 910-7.
- 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): 818-21.

- Kallioniemi, O. P., A. Kallioniemi, J. Piper, J. Isola, F. M. Waldman, J. W. Gray and D. Pinkel (1994). "Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors." Genes Chromosomes Cancer **10**(4): 231-43.
- du Manoir, S., E. Schrock, M. Bentz, M. R. Speicher, S. Joos, T. Ried, P. Lichter and T. Cremer (1995). "Quantitative analysis of comparative genomic hybridization." Cytometry **19**(1): 27-41.
- Bentz, M., A. Plesch, S. Stilgenbauer, H. Dohner and P. Lichter (1998). "Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization." Genes Chromosomes Cancer **21**(2): 172-5.
- Simon, R. (1999). "Zur Bedeutung genetischer Veränderungen für die Kanzerogenese solider Tumoren am Beispiel des humanen Urothelkarzinoms der Harnblase." (Dissertation), Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Münster: Westfälische Wilhelms-Universität
- Borozdin, W., J. M. Graham, Jr., D. Bohm, M. J. Bamshad, S. Spranger, L. Burke, M. Leipoldt and J. Kohlhase (2007). "Multigene deletions on chromosome 20q13.13-q13.2 including SALL4 result in an expanded phenotype of Okinohara syndrome plus developmental delay." Hum Mutat **28**(8): 830.
- Ruiz, C. (2006). "Identification and validation of amplification target genes in breast cancer." (Dissertation), Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Basel: Universität Basel
- Li, C. and W. H. Wong (2001). "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 31-6.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang and J. Zhang (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- R-Development-Core-Team (2005). "R: A language and environment for statistical computing." Wien: R Foundation for Statistical Computing.
- Venkatraman, E. S., Olshen, A. B. (2004). DNACopy: DNA copy number data analysis. R package version 1.4.0.
- 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): 844-7.
- 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): 1966-75.
- Moch, H., T. Kononen, O. P. Kallioniemi and G. Sauter (2001). "Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?" Adv Anat Pathol **8**(1): 14-20.
- Ruiz, C., S. Seibt, K. Al Kuraya, A. K. Siraj, M. Mirlacher, P. Schraml, R. Maurer, H. Spichtin, J. Torhorst, S. Popovska, R. Simon and G. Sauter (2006). "Tissue microarrays for

comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer." Int J Cancer **118**(9): 2190-4.

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

Hofmann, S. (2010). "Messung des Östrogenrezeptorstatus mit FISH und Immunhistochemie - Eine vergleichende TMA Studie an 814 Mammakarzinomen." (Dissertation), Medizinische Fakultät, Hamburg: Universitätsklinikum Eppendorf

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

Leipner, E. (2008). "Nachweis der ESR1-Amplifikation im Mammakarzinom mittels quantitativer PCR." (Dissertation), Medizinische Fakultät, Hamburg: Universitätsklinikum Eppendorf

Pfaffl, M. W. (2004). "Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." Biospektrum (10): 92-95.

Barlund, M., M. Tirkkonen, F. Forozan, M. M. Tanner, O. Kallioniemi and A. Kallioniemi (1997). "Increased copy number at 17q22-q24 by CGH in breast cancer is due to high-level amplification of two separate regions." Genes Chromosomes Cancer **20**(4): 372-6.

Slomovitz, B. M., C. C. Sun, P. T. Ramirez, D. C. Bodurka, P. Diaz and K. H. Lu (2004). "Does tamoxifen use affect prognosis in breast cancer patients who develop endometrial cancer?" Obstet Gynecol **104**(2): 255-60.

Heidenblad, M., D. Lindgren, T. Jonson, F. Liedberg, S. Veerla, G. Chebil, S. Gudjonsson, A. Borg, W. Mansson and M. Hoglund (2008). "Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors." BMC Med Genomics **1**: 3.

Staaf, J., G. Jonsson, M. Ringner, J. Vallon-Christersson, D. Grabau, A. Arason, H. Gunnarsson, B. A. Agnarsson, P. O. Malmstrom, O. T. Johannsson, N. Loman, R. B. Barkardottir and A. Borg (2010). "High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer." Breast Cancer Res **12**(3): R25.

Holst, F., P. R. Stahl, C. Ruiz, O. Hellwinkel, Z. Jehan, M. Wendland, A. Lebeau, L. Terracciano, K. Al-Kuraya, F. Janicke, G. Sauter and R. Simon (2007). "Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer." Nat Genet **39**(5): 655-60.

Lebeau, A., T. Grob, F. Holst, N. Seyedi-Fazlollahi, H. Moch, L. Terracciano, A. Turzynski, M. Choschzick, G. Sauter and R. Simon (2008). "Oestrogen receptor gene (ESR1) amplification is frequent in endometrial carcinoma and its precursor lesions." J Pathol **216**(2): 151-7.

Issa, R. M., A. Lebeau, T. Grob, F. Holst, H. Moch, L. Terracciano, M. Choschzick, G. Sauter and R. Simon (2009). "Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer." Mod Pathol **22**(2): 191-6.

Khan, S. A., M. A. Rogers, K. K. Khurana, M. M. Meguid and P. J. Numann (1998). "Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **90**(1): 37-42.

Shoker, B. S., C. Jarvis, D. R. Sibson, C. Walker and J. P. Sloane (1999). "Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast." J Pathol **188**(3): 237-44.

Wolff, A. C., M. E. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred, R. J. Cote, M. Dowsett, P. L. Fitzgibbons, W. M. Hanna, A. Langer, L. M. McShane, S. Paik, M. D. Pegram, E. A. Perez, M. F. Press, A. Rhodes, C. Sturgeon, S. E. Taube, R. Tubbs, G. H. Vance, M. van de Vijver, T. M. Wheeler and D. F. Hayes (2007). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer." J Clin Oncol **25**(1): 118-45.

Hammond, E. H., A. C. Wolff, D. F. Hayes and J. N. Schwartz (2009). "Reply to G. Sauter et al." J Clin Oncol **27**(30): e153-4; author reply e155-7.

Sauter, G., J. Lee, J. M. Bartlett, D. J. Slamon and M. F. Press (2009a). "Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations." J Clin Oncol **27**(8): 1323-33.

Sauter, G., J. Lee and D. J. Slamon (2009b). "Reply to G. Hammond et al." J Clin Oncol **27**(30): e155-7.

Lebeau, A., A. Turzynski, S. Braun, W. Behrhof, B. Fleige, W. D. Schmitt, T. J. Grob, L. Burkhardt, D. Holz, C. Jackisch, C. Thomssen, V. Muller and M. Untch (2010). "Reliability of human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry in breast core needle biopsies." J Clin Oncol **28**(20): 3264-70.

Vang Nielsen, K., B. Ejlersen, S. Muller, S. Moller, B. B. Rasmussen, E. Balslev, A. V. Laenkholm, P. Christiansen and H. T. Mouridsen (2011). "Amplification of ESR1 may predict resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer." Breast Cancer Res Treat **127**(2): 345-55.

Tanigami, A., T. Tokino, K. Takita, M. Ueda, F. Kasumi and Y. Nakamura (1992). "Detailed analysis of an amplified region at chromosome 11q13 in malignant tumors." Genomics **13**(1): 21-4.

Arriola, E., C. Marchio, D. S. Tan, S. C. Drury, M. B. Lambros, R. Natrajan, S. M. Rodriguez-Pinilla, A. Mackay, N. Tamber, K. Fenwick, C. Jones, M. Dowsett, A. Ashworth and J. S. Reis-Filho (2008). "Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines." Lab Invest **88**(5): 491-503.

Su, Z., B. Ning, H. Fang, H. Hong, R. Perkins, W. Tong and L. Shi (2011). "Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics." Expert Rev Mol Diagn **11**(3): 333-43.

Bennardo, N., A. Cheng, N. Huang and J. M. Stark (2008). "Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair." PLoS Genet **4**(6): e1000110.

Dunbier, A. K., H. Anderson, Z. Ghazoui, E. Lopez-Knowles, S. Pancholi, R. Ribas, S. Drury, K. Sidhu, A. Leary, L. A. Martin and M. Dowsett (2011). "ESR1 is co-expressed with closely adjacent uncharacterised genes spanning a breast cancer susceptibility locus at 6q25.1." PLoS Genet **7**(4): e1001382 [Epub 2011/05/10].

Bruder, C. E., A. Piotrowski, A. A. Gijsbers, R. Andersson, S. Erickson, T. Diaz de Stahl, U. Menzel, J. Sandgren, D. von Tell, A. Poplawski, M. Crowley, C. Crasto, E. C. Partridge, H. Tiwari, D. B. Allison, J. Komorowski, G. J. van Ommen, D. I. Boomsma, N. L. Pedersen, J. T. den Dunnen, K. Wirdefeldt and J. P. Dumanski (2008). "Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles." Am J Hum Genet **82**(3): 763-71.

Piotrowski, A., C. E. Bruder, R. Andersson, T. Diaz de Stahl, U. Menzel, J. Sandgren, A. Poplawski, D. von Tell, C. Crasto, A. Bogdan, R. Bartoszewski, Z. Bebok, M. Krzyzanowski, Z. Jankowski, E. C. Partridge, J. Komorowski and J. P. Dumanski (2008). "Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues." Hum Mutat **29**(9): 1118-24.

Aguilar, H., X. Sole, N. Bonifaci, J. Serra-Musach, A. Islam, N. Lopez-Bigas, M. Mendez-Pertuz, R. L. Beijersbergen, C. Lazaro, A. Urruticoechea and M. A. Pujana (2010). "Biological reprogramming in acquired resistance to endocrine therapy of breast cancer." Oncogene.

Jarvinen, T. A., M. Tanner, V. Rantanen, M. Barlund, A. Borg, S. Grenman and J. Isola (2000). "Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer." Am J Pathol **156**(3): 839-47.

Cappuzzo, F., M. Varella-Garcia, H. Shigematsu, I. Domenichini, S. Bartolini, G. L. Ceresoli, E. Rossi, V. Ludovini, V. Gregorc, L. Toschi, W. A. Franklin, L. Crino, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, Jr. and F. R. Hirsch (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." J Clin Oncol **23**(22): 5007-18.

Mass, R. D., M. F. Press, S. Anderson, M. A. Cobleigh, C. L. Vogel, N. Dybdal, G. Leiberman and D. J. Slamon (2005). "Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab." Clin Breast Cancer **6**(3): 240-6.

Roepman, P., H. M. Horlings, O. Krijgsman, M. Kok, J. M. Bueno-de-Mesquita, R. Bender, S. C. Linn, A. M. Glas and M. J. van de Vijver (2009). "Microarray-based determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 receptor status in breast cancer." Clin Cancer Res **15**(22): 7003-11.

Geisinger, K. R., R. B. Marshall, T. E. Kute and H. D. Homesley (1986). "Correlation of female sex steroid hormone receptors with histologic and ultrastructural differentiation in adenocarcinoma of the endometrium." Cancer **58**(7): 1506-17.

- Ehrlich, C. E., P. C. Young, F. B. Stehman, G. P. Sutton and W. M. Alford (1988). "Steroid receptors and clinical outcome in patients with adenocarcinoma of the endometrium." Am J Obstet Gynecol **158**(4): 796-807.
- Ingram, S. S., J. Rosenman, R. Heath, T. M. Morgan, D. Moore and M. Varia (1989). "The predictive value of progesterone receptor levels in endometrial cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **17**(1): 21-7.
- Carcangiu, M. L., J. T. Chambers, I. M. Voynick, M. Pirro and P. E. Schwartz (1990). "Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part I: Clinical and histologic correlations." Am J Clin Pathol **94**(3): 247-54.
- Creasman, W. T. (1993). "Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer." Cancer **71**(4 Suppl): 1467-70.
- Kadar, N., J. H. Malfetano and H. D. Homesley (1993). "Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients." Gynecol Oncol **50**(3): 281-6.
- Nyholm, H. C., I. J. Christensen and A. L. Nielsen (1995). "Progesterone receptor levels independently predict survival in endometrial adenocarcinoma." Gynecol Oncol **59**(3): 347-51.
- Iversen, O. E., E. Utaaker and E. Skaarland (1988). "DNA ploidy and steroid receptors as predictors of disease course in patients with endometrial carcinoma." Acta Obstet Gynecol Scand **67**(6): 531-7.
- Lukes, A. S., M. F. Kohler, C. F. Pieper, B. J. Kerns, R. Bentley, G. C. Rodriguez, J. T. Soper, D. L. Clarke-Pearson, R. C. Bast, Jr. and A. Berchuck (1994). "Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer." Cancer **73**(9): 2380-5.
- Sivridis, E., A. Giatromanolaki, M. Koukourakis and P. Anastasiadis (2001). "Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression." Virchows Arch **438**(5): 470-7.
- Baak, J. P., G. L. Mutter, S. Robboy, P. J. van Diest, A. M. Uytterlinde, A. Orbo, J. Palazzo, B. Fiane, K. Lovslett, C. Burger, F. Voorhorst and R. H. Verheijen (2005). "The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system." Cancer **103**(11): 2304-12.
- Leary, J. A., B. G. Edwards, C. R. Houghton, R. F. Kefford and M. L. Friedlander (1992). "Amplification of HER-2/neu oncogene in human ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **2**(6): 291-294.
- Wu, R., L. Lin, D. G. Beer, L. H. Ellenson, B. J. Lamb, J. M. Rouillard, R. Kuick, S. Hanash, D. R. Schwartz, E. R. Fearon and K. R. Cho (2003). "Amplification and overexpression of the L-MYC proto-oncogene in ovarian carcinomas." Am J Pathol **162**(5): 1603-10.

- Dimova, I., S. Raitcheva, R. Dimitrov, N. Doganov and D. Toncheva (2006). "Correlations between c-myc gene copy-number and clinicopathological parameters of ovarian tumours." Eur J Cancer **42**(5): 674-9.
- Lassus, H., H. Sihto, A. Leminen, H. Joensuu, J. Isola, N. N. Nupponen and R. Butzow (2006). "Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma." J Mol Med **84**(8): 671-81.
- Courjal, F., G. Louason, P. Speiser, D. Katsaros, R. Zeillinger and C. Theillet (1996). "Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors." Int J Cancer **69**(4): 247-53.
- Masciullo, V., G. Scambia, M. Marone, C. Giannitelli, G. Ferrandina, A. Bellacosa, P. Benedetti Panici and S. Mancuso (1997). "Altered expression of cyclin D1 and CDK4 genes in ovarian carcinomas." Int J Cancer **74**(4): 390-5.
- Diebold, J., K. Mosinger, G. Peiro, U. Pannekamp, C. Kaltz, G. B. Baretton, W. Meier and U. Lohrs (2000). "20q13 and cyclin D1 in ovarian carcinomas. Analysis by fluorescence in situ hybridization." J Pathol **190**(5): 564-71.
- Xin, X. Y. (1993). "[The amplification of c-myc, N-ras, c-erb B oncogenes in ovarian malignancies]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi **28**(7): 405-7, 442.
- Bian, M., Q. Fan and S. Huang (1995). "[Amplification of proto-oncogenes C-myc, C-N-ras, C-Ki-ras, C-erbB2 in ovarian carcinoma]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi **30**(7): 406-9.
- Trope, C., C. Marth and J. Kaern (2000). "Tamoxifen in the treatment of recurrent ovarian carcinoma." Eur J Cancer **36 Suppl 4**: S59-61.
- Perez-Gracia, J. L. and E. M. Carrasco (2002). "Tamoxifen therapy for ovarian cancer in the adjuvant and advanced settings: systematic review of the literature and implications for future research." Gynecol Oncol **84**(2): 201-9.
- Balbi, G., L. D. Piano, A. Cardone and G. Cirelli (2004). "Second-line therapy of advanced ovarian cancer with GnRH analogs." Int J Gynecol Cancer **14**(5): 799-803.
- Papadimitriou, C. A., S. Markaki, J. Siapkarakas, G. Vlachos, E. Efstathiou, I. Grimani, G. Hamilos, M. Zorzou and M. A. Dimopoulos (2004). "Hormonal therapy with letrozole for relapsed epithelial ovarian cancer. Long-term results of a phase II study." Oncology **66**(2): 112-7.
- Levine, D., K. Park, M. Juretzka, J. Esch, M. Hensley, C. Aghajanian, S. Lewin, J. Konner, F. Derosa, D. Spriggs, A. Iasonos and P. Sabbatini (2007). "A phase II evaluation of goserelin and bicalutamide in patients with ovarian cancer in second or higher complete clinical disease remission." Cancer **110**(11): 2448-56.
- Li, Y. F., W. Hu, S. Q. Fu, J. D. Li, J. H. Liu and J. J. Kavanagh (2008). "Aromatase inhibitors in ovarian cancer: is there a role?" Int J Gynecol Cancer **18**(4): 600-14.
- Hasan, J., N. Ton, S. Mullamitha, A. Clamp, A. McNeilly, E. Marshall and G. C. Jayson (2005). "Phase II trial of tamoxifen and goserelin in recurrent epithelial ovarian cancer." Br J Cancer **93**(6): 647-51.

- Wagner, U., A. du Bois, J. Pfisterer, J. Huober, S. Loibl, H. J. Luck, J. Sehouli, M. Gropp, A. Stahle, B. Schmalfeldt, W. Meier and C. Jackisch (2007). "Gefitinib in combination with tamoxifen in patients with ovarian cancer refractory or resistant to platinum-taxane based therapy--a phase II trial of the AGO Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR 2.6)." Gynecol Oncol **105**(1): 132-7.
- Karagol, H., P. Saip, K. Uygun, M. Caloglu, Y. Eralp, F. Tas, A. Aydiner and E. Topuz (2007). "The efficacy of tamoxifen in patients with advanced epithelial ovarian cancer." Med Oncol **24**(1): 39-43.
- Brown, L. A., J. Hoog, S. F. Chin, Y. Tao, A. A. Zayed, K. Chin, A. E. Teschendorff, J. F. Quackenbush, J. C. Marioni, S. Leung, C. M. Perou, T. O. Neilsen, M. Ellis, J. W. Gray, P. S. Bernard, D. G. Huntsman and C. Caldas (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet **40**(7): 806-7; author reply 810-2.
- Vincent-Salomon, A., V. Raynal, C. Lucchesi, N. Gruel and O. Delattre (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet **40**(7): 809; author reply 810-2.
- Moelans, C. B., H. N. Monsuur, J. H. de Pinth, R. D. Radersma, R. A. de Weger and P. J. van Diest (2010). "ESR1 amplification is rare in breast cancer and is associated with high grade and high proliferation: A multiplex ligation-dependent probe amplification study." Cell Oncol.
- Tomita, S., Z. Zhang, M. Nakano, M. Ibusuki, T. Kawazoe, Y. Yamamoto and H. Iwase (2009). "Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients." Cancer Sci **100**(6): 1012-7.
- Tsiambas, E., S. N. Georgiannos, N. Salemis, D. Alexopoulou, S. Lambropoulou, B. Dimo, I. Ioannidis, C. Kravvaritis, A. Karameris, E. Patsouris and S. Dourakis (2010). "Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays analysis." Med Oncol: [Epub 2010/05/12].
- Moelans, C. B., R. A. de Weger, H. N. Monsuur, A. H. Maes and P. J. van Diest (2010a). "Molecular differences between ductal carcinoma in situ and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study." Anal Cell Pathol (Amst) **33**(3): 165-73.
- Moelans, C. B., R. A. de Weger, H. N. Monsuur, R. Vijzelaar and P. J. van Diest (2010b). "Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes." Mod Pathol **23**(7): 1029-39.
- Bartlett, J. M., F. M. Campbell and E. A. Mallon (2008). "Determination of HER2 amplification by in situ hybridization: when should chromosome 17 also be determined?" Am J Clin Pathol **130**(6): 920-6.
- Tan, D. S., M. B. Lambros, C. Marchio and J. S. Reis-Filho (2008). "ESR1 amplification in endometrial carcinomas: hope or hyperbole?" J Pathol **216**(3): 271-4.
- Marchio, C., R. Natrajan, K. K. Shiu, M. B. Lambros, S. M. Rodriguez-Pinilla, D. S. Tan, C. J. Lord, D. Hungermann, K. Fenwick, N. Tamber, A. Mackay, J. Palacios, A. Sapino, H.

- Buerger, A. Ashworth and J. S. Reis-Filho (2008). "The genomic profile of HER2-amplified breast cancers: the influence of ER status." *J Pathol* **216**(4): 399-407.
- Albertson, D. G. (2008). "Conflicting evidence on the frequency of ESR1 amplification in breast cancer." *Nat Genet* **40**(7): 821-2.
- Xing, Y., C. V. Johnson, P. T. Moen, Jr., J. A. McNeil and J. Lawrence (1995). "Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains." *J Cell Biol* **131**(6 Pt 2): 1635-47.
- Melcak, I., S. Cermanova, K. Jirsova, K. Koberna, J. Malinsky and I. Raska (2000). "Nuclear pre-mRNA compartmentalization: trafficking of released transcripts to splicing factor reservoirs." *Mol Biol Cell* **11**(2): 497-510.
- Muhlemann, O., C. S. Mock-Casagrande, J. Wang, S. Li, N. Custodio, M. Carmo-Fonseca, M. F. Wilkinson and M. J. Moore (2001). "Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription." *Mol Cell* **8**(1): 33-43.
- Jolly, C., F. Mongelard, M. Robert-Nicoud and C. Vourc'h (1997). "Optimization of nuclear transcript detection by FISH and combination with fluorescence immunocytochemical detection of transcription factors." *J Histochem Cytochem* **45**(12): 1585-92.
- Adelaide, J., P. Finetti, E. Charafe-Jauffret, J. Wicinski, J. Jacquemier, C. Sotiriou, F. Bertucci, D. Birnbaum and M. Chaffanet (2008). "Absence of ESR1 amplification in a series of breast cancers." *Int J Cancer* **123**(12): 2970-2.
- Nessling, M., K. Richter, C. Schwaenen, P. Roerig, G. Wrobel, S. Wessendorf, B. Fritz, M. Bentz, H. P. Sinn, B. Radlwimmer and P. Lichter (2005). "Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue." *Cancer Res* **65**(2): 439-47.
- Schummer, M., A. Green, J. D. Beatty, B. Y. Karlan, S. Karlan, J. Gross, S. Thornton, M. McIntosh and N. Urban (2010). "Comparison of breast cancer to healthy control tissue discovers novel markers with potential for prognosis and early detection." *PLoS One* **5**(2): e9122.
- Yau, C., V. Fedele, R. Roydasgupta, J. Fridlyand, A. Hubbard, J. W. Gray, K. Chew, S. H. Dairkee, D. H. Moore, F. Schittulli, S. Tommasi, A. Paradiso, D. G. Albertson and C. C. Benz (2007). "Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers." *Breast Cancer Res* **9**(5): R59.
- Sun, Z., Y. W. Asmann, K. R. Kalari, B. Bot, J. E. Eckel-Passow, T. R. Baker, J. M. Carr, I. Khrebtukova, S. Luo, L. Zhang, G. P. Schroth, E. A. Perez and E. A. Thompson (2011). "Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing." *PLoS One* **6**(2): e17490 [Epub 2011/03/03].
- Reis-Filho, J. S., S. Drury, M. B. Lambros, C. Marchio, N. Johnson, R. Natrajan, J. Salter, P. Levey, O. Fletcher, J. Peto, A. Ashworth and M. Dowsett (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" *Nat Genet* **40**(7): 809-10; author reply 810-2.
- Chin, K., S. DeVries, J. Fridlyand, P. T. Spellman, R. Roydasgupta, W. L. Kuo, A. Lapuk, R. M. Neve, Z. Qian, T. Ryder, F. Chen, H. Feiler, T. Tokuyasu, C. Kingsley, S. Dairkee, Z. Meng, K. Chew, D. Pinkel, A. Jain, B. M. Ljung, L. Esserman, D. G. Albertson, F. M.

- Waldman and J. W. Gray (2006). "Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies." Cancer Cell **10**(6): 529-41.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-52.
- Nielsen, T. O., F. D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L. A. Akslen, J. Ragaz, A. M. Gown, C. B. Gilks, M. van de Rijn and C. M. Perou (2004). "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Clin Cancer Res **10**(16): 5367-74.
- Adelaide, J., P. Finetti, I. Bekhouche, L. Repellini, J. Geneix, F. Sircoulomb, E. Charafe-Jauffret, N. Cervera, J. Desplans, D. Parzy, E. Schoenmakers, P. Viens, J. Jacquemier, D. Birnbaum, F. Bertucci and M. Chaffanet (2007). "Integrated profiling of basal and luminal breast cancers." Cancer Res **67**(24): 11565-75.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-45.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-7.
- Szollosi, J., M. Balazs, B. G. Feuerstein, C. C. Benz and F. M. Waldman (1995). "ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer." Cancer Res **55**(22): 5400-7.
- Holst, F., R. Simon and P. Tennstedt (2009). "Estrogen Receptor (ESR1) Amplification in Breast Cancer: A Current Review." Connection **13**(July).
- Arends, J. (2005) "Tumorinduzierte Stoffwechselveränderungen und Tumorkachexie." Kompodium Heimpärenterale Ernährung (HPE) Hallbergmoos, Travacare GmbH  
**September** **2005**, URL:  
<http://www.heudorf.de/arbeitsbeispiele/pharma/img/Tumorkachexie.pdf>
- Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E. R. Fisher, D. L. Wickerham, J. Bryant and N. Wolmark (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." N Engl J Med **351**(27): 2817-26.
- Kennecke, H., H. McArthur, I. A. Olivotto, C. Speers, C. Bajdik, S. K. Chia, S. Ellard, B. Norris, M. Hayes, J. Barnett and K. A. Gelmon (2008). "Risk of early recurrence among postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer treated with adjuvant tamoxifen." Cancer **112**(7): 1437-44.
- Horlings, H. M., A. Bergamaschi, S. H. Nordgard, Y. H. Kim, W. Han, D. Y. Noh, K. Salari, S. A. Joosse, F. Reyat, O. C. Lingjaerde, V. N. Kristensen, A. L. Borresen-Dale, J. Pollack and M. J. van de Vijver (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet **40**(7): 807-8; author reply 810-2.
- Nembrot, M., B. Quintana and J. Mordoh (1990). "Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptor-positive human breast tumors." Biochem Biophys Res Commun **166**(2): 601-7.

Watts, C. K., M. L. Handel, R. J. King and R. L. Sutherland (1992). "Oestrogen receptor gene structure and function in breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 529-36.

Stahl, P. R. (2009). "Prävalenz und klinische Relevanz der Östrogen Rezeptor Amplifikation beim Mammakarzinom." (Dissertation), Medizinische Fakultät Hamburg: Universitätsklinikum Eppendorf

Seyedi-Fazlollahi, N. (2010). "Amplifikation von ESR1 im Endometriumkarzinom und seine Vorstufen." (Dissertation), Medizinische Fakultät, Hamburg: Universitätsklinikum Eppendorf

Wendland, M. (2009). "Feinkartierung des Östrogen-Rezeptor alpha (ESR1 )-Amplicons beim Mammakarzinom." (Dissertation), Medizinische Fakultät, Hamburg: Universitätsklinikum Eppendorf

## Danksagungen

Mein Dank gilt all denjenigen, die zum Zustandekommen der vorliegenden Arbeit auf die eine oder andere Weise mit beigetragen haben.

Hervorheben möchte ich hierbei Prof. Dr. med. Guido Sauter und PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, die das Projekt, dessen Teil diese Arbeit ist (siehe Kapitel 1.6), konzipiert und geleitet haben. Alle Arbeiten wurden von ihnen durch wissenschaftliche Betreuung begleitet. Hierfür und für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen gilt mein Dank.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls namentlich bei Dr. med. Phillip Stahl, Dr. med. dent. Marc Wendland und Dr. med. Niloufar Seyedi-Fazlollahi für die Zusammenarbeit.

Weiterer besonderer Dank gilt PD Dr. med. Annette Lebau, Dr. med Rana Issa und Dr. rer. nat. Olaf Hellwinkel für die medizinisch-wissenschaftliche Beratung und Unterstützung.

Zudem möchte ich mich besonders bei Silvia Schnöger und Marlies Sachs für die freundliche technische Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Dobler danke ich für den Vorsitz der Prüfungskommission, sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Lohr und Frau PD Dr. rer. nat. Annette Lebeau für die Begutachtung der Disputation.

## Anhang

**Tabelle 10** Verwendete pBAC-Klone

Sanger Name	RZPDB-Name	Länge	Sequenz
RP11-450E24 („Version Cancer 1G3“)	RZPDB737C122127D6	207 kb	innerhalb <i>ESRI</i>
RP1-63I5	RZPDB737HO34D6	87 kb	innerhalb <i>ESRI</i>
RP3-443C4	RZPDB737F0416D6	67 kb	<i>ESRI</i> -Rand 5'
RP3-404G5	RZPDB737D0115D6	119 kb	49 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-282P11	RZPDB737H062082D	114 kb	169 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-108N8	RZPDB737G032039D6	84 kb	281 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-351K16	RZPDB737F082101D6	105 kb	363 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP3-403M6	RZPDB737C1115D6	86 kb	466 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-613F7	RZPDB737C042160D6	51 kb	553 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-236H13	RZPDB737E1210D	4 kb	604 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-297M16	RZPDB737C0812D6	65 kb	608 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-292B18	RZPDB737BO612D	109 kb	674 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-99E18	RZPDB737CO86D	100 kb	783 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-44A20	RZPDB737B104D	165 kb	883 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-25C17	RZPDB737B102012D	63 kb	904 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP11-136K14	RZPDB737FO92047D	150 kb	1111 kb 5' von <i>ESRI</i>
RP1-130E4	RZPDB737D027D6	109 kb	<i>ESRI</i> -Rand 3' von <i>ESRI</i>
RP11-434E7	RZPDB737D072123D6	9 kb	54 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP3-445H2	RZPDB737FO816D6	139 kb	63 kb 3' von <i>ESRI</i> (SYNE)
RP11-809I23	RZPDB737E1222186D	70kb	202 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP3-398G3	RZPDB737BO215D	86 kb	273 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-289C14	RZPDB737BO72083D	17 kb	353 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-133I21	RZPDB737D052046D	87 kb	373 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP3-358E10	RZPDB737BO714D	97 kb	457 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP1-9B16	RZPDB737H112D	87 kb	553 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP4-546K19	RZPDB737EO419D	26 kb	639 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP1-200K18	RZPDB737GO99D	82 kb	665 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP3-468K3	RZPDB737DO117D	90 kb	747 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP1-101K10	RZPDB737DO46D	112 kb	838 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-398I24	RZPDB737EO82113D	45 kb	950 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-535A9	RZPDB737BO62147D	91 kb	994 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP1-193H23	RZPDB737E109D	92 kb	1086 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-289C14	RZPDB737BO72083D	17 kb	353 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP11-133I21	RZPDB737D052046D	87 kb	373 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP3-358E10	RZPDB737BO714D	97 kb	457 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP1-9B16	RZPDB737H112D	87 kb	553 kb 3' von <i>ESRI</i>
RP4-546K19	RZPDB737EO419D	26 kb	639 kb 3' von <i>ESRI</i>

---

RP1-200K18	RZPDB737GO99D	82 kb	665 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP3-468K3	RZPDB737DO117D	90 kb	747 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP1-101K10	RZPDB737DO46D	112 kb	838 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP11-398I24	RZPDB737EO82113D	45 kb	950 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP11-535A9	RZPDB737BO62147D	91 kb	994 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP1-193H23	RZPDB737E109D	92 kb	1086 kb 3' von <i>ESR1</i>
RP11-788M5	RZPDB737G102183D	195 kb	<i>PGR</i> überspannend
RP11-676P5	RZPDB737H022169D	139 kb	innerhalb <i>ESR2</i> und <i>SYNE2</i>
RP11-712C19	RZPDB737B072174D	143 kb	mit <i>ESR1</i> 107 kb 3'-überlappend

**Tabelle 11** Zusammenhang zwischen ER-Expression und der Art des Mammakarzinoms

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

\* gemäß Allred

\*\* versus Duktales Karzinom

**Tabelle 12** Zusammenhang zwischen erhöhter *ESR1*-Kopiezahl und der Art des Mammakarzinoms

		Gesamt (n)	Analysierbar (n)	Amplifikation	„gain“	P
Tumore		2197	1739	20,6 %	15,3 %	
Histologie	Duktales Karzinom	1552	1207	21,5 %	16,0 %	
	Lobuläres Karzinom	312	207	19,3 %	13,8 %	
	Muzinöses Karzinom	69	37	35,6 %	24,4 %	0,0337*
	Medulläres Karzinom	58	48	2,0 %	2,0 %	< 0,0001*
	Tubuläres Karzinom	56	42	18,6 %	14,0 %	
	Cribriformes Karzinom	65	55	29,8 %	12,3 %	
	Papilläres Karzinom	30	27	19,2 %	15,4 %	
	Andere	79	56	4,9 %	14,8 %	
pT-Stadium	pT1	820	578	22,3 %	15,6 %	0,7295
	pT2	1023	811	19,7 %	14,8 %	
	pT3	124	92	18,8 %	13,5 %	
	pT4	242	189	17,8 %	16,8 %	
Nodalstatus	pN0	950	711	22,3 %	14,4 %	0,0422
	pN1	793	608	16,5 %	16,5 %	
	pN2	121	90	14,8 %	12,5 %	
Tumorgrad	G1	545	421	25,6 %	15,2 %	< 0,0001
	G2	844	685	21,6 %	18,5 %	
	G3	655	571	15,0 %	11,7 %	

\* versus duktales Karzinom

**Tabelle 13** ER-Expression in Tumoren des Endometriums und endometroiden Hyperplasien

		Anzahl auf TMA	analysierbar (n)	ER-IHC-Ergebnis („Allred-Score“)				p
				0 - 2 (%)	3 - 4 (%)	5 - 6 (%)	7 - 8 (%)	
Tumore	gesamt	368	304	11,5	10,2	21,4	57,0	
Histologie	endometroide Karzinome	304	258	7,0	7,8	22,9	62,4	< 0,0001
	seröse Karzinome	26	22	36,4	22,7	9,1	31,8	
	andere Karzinome	38	24	37,5	25,0	16,7	20,9	
pT-Status	pT1	201	166	6,6	9,6	20,5	63,3	0,0084
	pT2	62	54	9,3	9,3	31,5	50,0	
	pT3	43	38	29,0	18,4	15,8	36,8	
	pT4	4	4	25,0	0	25,0	50,0	
histoloischer Grad	G1	177	142	4,9	8,5	23,9	62,7	0,0016
	G2	105	91	12,1	9,9	17,6	60,4	
	G3	81	67	25,4	13,4	19,4	41,8	
Hyperplasie	gesamt	GS*	43	0	2,3	25,6	72,1	
Histologie	komplex mit Atypie	GS*	19	0	5,3	31,6	63,2	
	komplex ohne Atypie	GS*	10	0	0	30,0	70,0	
	einfach ohne Atypie	GS*	14	0	0	14,2	85,7	

\* Es wurden konventionelle Großschnitte (GS) analysiert.

**Tabelle 14** *ESR1*-Amplifikationen in Tumoren des Endometriums und endometroiden Hyperplasien

		Anzahl auf TMA	<i>ESR1</i> -FISH-Ergebnis			p
			analysierbar (n)	Amplifikation (%)	„gain“ (%)	
Tumore	gesamt	368	176	22,7	5,7	
Histologie	endometroide	304				
	Karzinome		148	23,0	6,8	
	seröse Karzinome	26	12	25,0	0	
	andere Karzinome	38	16	18,7	0	
pT-Status	pT1	201	98	23,4	6,1	0,6167
	pT2	62	36	25,0	8,3	
	pT3	43	21	9,5	4,8	
	pT4	4	2	0	0	
histoloischer Grad	G1	177	84	17,9	5,9	0,4763
	G2	105	46	26,1	8,7	
	G3	81	43	25,6	2,3	
Hyperplasie	gesamt	LS*	43	25,6	0	
Histologie	komplex mit Atypie	LS*	19	31,6	0	
	komplex ohne Atypie	LS*	10	30,0	0	
	einfach ohne Atypie	LS*	14	14,3	0	

\* Es wurden konventionelle Großschnitte (GS) analysiert.

**Tabelle 15** Zusammenhang zwischen den histopathologischen Daten des ovarialen Karzinoms, der ER-Expression und der *ESR1*-Amplifikation.

Ergebnisse der Östrogenrezeptor-Immunhistochemie („Allred-Score“) (%)									Ergebnisse der <i>ESR1</i> -FISH		
	Anzahl auf TMA	analysiert (n)	0-2	3-4	5-6	7-8	p-Wert	analysiert (n)	amplifiziert (%)	p-Wert	
Histologie	Alle Tumore	428	384	62,8	11,2	16,7	9,4		243	2,1	
	Seröse Karzinome	172	158	48,7	16,5	22,8	12,0		105	1,9	
	Mucinöse Karzinome	76	69	84,1	2,9	7,2	5,8		40	2,5	0,6098*
	Endometroide Karzinome	85	80	55,0	13,8	21,3	10,0		44	4,5	
	Müllersche Mischtumore	15	14	100,0	0,0	0,0	0,0		7	0,0	
	Klarzell-Tumore	24	24	100,0	0,0	0,0	0,0		13	0,0	
	Maligne Brenner-Tumore	5	4	50,0	0,0	50,0	0,0		3	0,0	
	SQCC**	1	1	100,0	0,0	0,0	0,0		1	0,0	
	Keimstrang-Stroma-Tumore	10	10	60,0	10,0	0,0	30,0		8	0,0	
	Yolk-Sack-Tumore	4	4	75,0	25,0	0,0	0,0		2	0,0	
	Undifferenziertes Karzinom	15	15	46,7	13,3	26,7	13,3		10	0,0	
Andere seltene Typen	5	5	100,0	0,0	0,0	0,0		10	0,0		
pT Status	pT1	58	54	75,9	5,6	13,0	5,7	0,1343	25	0,0	
	pT2	36	32	78,1	6,3	6,3	9,4		19	0,0	
	pT3	99	88	58,0	15,9	18,2	8,0		58	1,7	
Silverberg Grad	G1	81	71	71,8	5,6	14,1	8,5	0,038	33	0,0	
	G2	91	82	72,0	11,0	12,2	4,9		52	0,0	
	G3	91	85	51,8	20,0	21,2	7,1		55	1,8	
*mucinös versus endometroid											
*mucinös versus endometroid ** Squamöses Zell Karzinom											

**Tabelle 16** *ESRI*-Amplifikationen in der Literatur (Brustkrebs).  
Amplifikationsraten in Klammern (%) sind hochgerechnet und beziehen sich auf ein Kollektiv mit natürlicher Verteilung von ER-Positivität und Rezidivierung. Siehe auch **Abbildung 48**.

Publikation	Daten / <i>ESRI</i> -Amplifikationsrate	Methode
<b>Nembrot, Quintana et al. 1990</b> Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptor-positive human breast tumors. <u>Biochem Biophys Res Commun.</u> 1990 Jan 30;166(2):601-7.	Amp.: 43 % (~ 30 %) n = 14 (ER+) (6 von 14)	Southern Blot
<b>Watts, Handel et al. 1992</b> Oestrogen receptor gene structure and function in breast cancer. <u>J Steroid Biochem Mol Biol.</u> 1992 Mar;41(3-8):529-36.	Amp.: 2,7 % n = 37	Southern Blot
<b>Schuur and Weigel 2000</b> Monoallelic Amplification of Estrogen Receptor- $\alpha$ Expression in Breast Cancer. <u>Cancer Research</u> 2000 May 15;60(10):2598-601.	Amp.: ~ 20 % (43 %) n = 7 (2 von 7 ER+)  (aber 5 von 14 ER-, gesamt: 38 %)	RFLP-PCR
<b>Nessling, Richter et al. 2005</b> Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. <u>Cancer Research</u> 2005 Jan 15;65(2):439-47.	Amp.: 10 %, „gain“ 16 % (für amp. = Ratio > 2) Amp.: 19 %, „gain“ 7 % (für amp. = Ratio $\geq$ 2) n = 30	aCGH
<b>Hicks, Krasnitz et al. 2006</b> Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. <u>Genome Research</u> 2006 Dec;16(12):1465-79.	Amp.: ~ 7 % (kombinierter Index) n = 99	aCGH
<b>Holst, Stahl et al. 2007</b> Estrogen receptor alpha ( <i>ESRI</i> ) gene amplification is frequent in breast cancer. <u>Nature Genetics</u> 2007 May;39(5):655-60.	Amp.: 5 %, „gain“: 5 % n = 21	Genchip
	Amp.: 20,6 %, „gain“: 15,3 % n = 1,739 (Ansprechen)	FISH
<b>Brown, Hoog et al. 2008</b> <i>ESRI</i> gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7):806-7.	Amp.: 2 %, „gain“: 13 % n = 171 Amp.: 0 %, „gain“: 5 % n = 143	aCGH
	Amp.: 2 %, „gain“: 7 % n = 77	Genchip
	incr. copy number: 16 % ( <i>ESR2</i> -Referenz)	
	incr. copy number: 2,4 – 4 % ( <i>EIF5B</i> - und <i>PVR</i> -Referenz) n = 125	qPCR
	Amp.: 1 % n = 334	FISH

<b>Vincent-Salomon, Raynal et al. 2008</b> <i>ESR1</i> gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7):809.	Amp.: 0,9 % n = 341	aCGH
	Amp.: 2 % n = 168	qPCR
<b>Horlings, Bergamaschi et al. 2008</b> <i>ESR1</i> gene amplification in breast cancer: a common phenomenon ? <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7):807-8.	Amp.: 1 %, „gain“: 1 % n = 148,	aCGH
	Amp.: 10 %, „gain“: 3 % n = 31,	
	Amp.: 0 %, „gain“: 7 % n = 68,	
	Amp.: 0 %, „gain“: 5 % n = 37	Genchip
Amp.: 3 %, „gain“: 2 % n = 89,		
	Amp.: 0 %, „gain“: 4 % n = 50,	
	Amp.: 4 %, „gain“: 0 % n = 112.	
<b>Reis-Filho, Drury et al. 2008</b> <i>ESR1</i> gene amplification in breast cancer: a common phenomenon ? <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7):809-10.	Amp.: 4,3 %, „gain“: 7,1 % n = 70	aCGH
	Amp.: 3,7 % n = 54	qPCR
	Amp.: 5,7 %, „gain“: 5,7 %, n = 35	
	Amp.: 2,8 %, „gain“: 0 %, n = 35  (abhängig vom Referenzgen)	
	Amp.: 1,4 %, n = 245	CISH
<b>Albertson 2008</b> Conflicting evidence on the frequency of <i>ESR1</i> amplification in breast cancer. <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7):821-2.	Spekulation über „hoch transkribiertes offenes Chromatin“ als Ursache für möglicherweise als Gencluster mißinterpretierte „FISH-Signal-Artefakte“.	Diskussion
<b>Holst, Stahl et al. 2008</b> Reply to <i>ESR1</i> gene amplification in breast cancer: a common phenomenon ? <u>Nature Genetics</u> 2008 Jul;40(7): 810-2.	Bestätigung der <i>ESR1</i> -Amplifikation in 10 zufällig ausgewählten, gemäß FISH-Analyse <i>ESR1</i> -amplifizierten Fällen.	qPCR Diskussion
<b>Tan, Lambros et al. 2008</b> <i>ESR1</i> amplification in endometrial carcinomas: hope or Hyperbole ? <u>J Pathol.</u> 2008 Nov;216(3):271-4.	siehe Kapitel 4.4.1	Diskussion

<p><b>Adelaide, Finetti et al. 2008</b></p> <p>Absence of <i>ESR1</i> amplification in a series of breast cancers.</p> <p><u>Int J Cancer</u>. 2008 Dec 15;123(12):2970-2.</p>	<p>Amp.: 0 %</p> <p>n = 274</p>	aCGH
<p><b>Tomita, Zhang et al. 2009</b></p> <p>Estrogen receptor alpha gene <i>ESR1</i> amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients.</p> <p><u>Cancer Sci</u>. 2009 Jun;100(6):1012-7.</p>	<p>Amp.: 22,6 %, „gain“: 11,3 %</p> <p>n = 133 (Ansprechen)</p>	FISH
<p><b>Moelans, Monsuur et al. 2010</b></p> <p><i>ESR1</i> amplification is rare in breast cancer and is associated with high grade and high proliferation: A multiplex ligation-dependent probe amplification study.</p> <p><u>Anal Cell Pathol (Amst)</u>. 2010;33(1):13-8.</p>	<p>Amp.: 2 %, „gain“: 6 %</p> <p>n = 135</p>	MLPA-PCR
<p><b>Tsiambas, Georgiannos et al. 2010</b></p> <p>Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays analysis</p> <p><u>Med Oncol</u>. 2010 May 11. [Epub ahead of print]</p>	<p>Amp.: 21,6 %</p> <p>n = 60</p>	FISH
<p><b>Moelans, de Weger et al. 2010</b></p> <p>Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes.</p> <p><u>Mod Pathol</u>. 2010 Jul;23(7):1029-39.</p>	<p>Erhöhte Kopiezahl: 16 %</p> <p>n = 104</p>	MLPA-PCR
<p><b>Aguilar, Sole et al. 2010</b></p> <p>Biological reprogramming in acquired resistance to endocrine therapy of breast cancer.</p> <p><u>Oncogene</u> 2010 Nov 11;29(45):6071-83. Epub 2010 Aug 16.</p>	<p><i>ESR1</i>-Amplifikation in LTED-MCF7-Zelllinie</p>	aCGH
<p><b>Moelans, de Weger et al. 2010</b></p> <p>Molecular differences between ductalcarcinoma <i>in situ</i> and adjacent invasive breast carcinoma: A multiplex ligation-dependent probe amplification study.</p> <p><u>Anal Cell Pathol (Amst)</u> 2010;33(3):165-73.</p>	<p>Erhöhte Kopiezahl: 18 %</p> <p>n = 39</p>	MLPA-PCR
<p><b>Vang Nielsen, Ejertsen et al. 2011</b></p> <p>Amplification of <i>ESR1</i> may predict resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer.</p> <p><u>Breast cancer Res Treat</u>. 2011 Jun;127(2):345-55. Epub 2010 Jun 17.</p>	<p>Amp.: 14 % (~ 6,5 %),</p> <p>13 von 94 (ER +, „case-control“-Studie)</p> <p>(Resistenz)</p>	FISH
<p><b>Dunbier, Anderson et al. 2011</b></p> <p><i>ESR1</i> is Co-Expressed with Closely Adjacent Uncharacterised Genes Spanning a Breast Cancer Susceptibility Locus at 6q25.1.</p> <p><u>PLoS Genet</u>. 2011 Apr;7(4):e1001382. Epub 2011 Apr 28.</p>	<p>Amp.: 2 % (1,7 %), „gain“: 18 % (13,6 %)</p> <p>n = 44 (ER +)</p>	aCGH

**Tabelle 17** *ESRI*-Amplifikationen in der Literatur (Krebs des Endometriums und des Ovars)

<b>Publikation</b>	<b>Daten / <i>ESRI</i>-Amplifikationsrate</b>	<b>Methode</b>
<b>Lebeau, Grob et al. 2008</b> Oestrogen receptor gene ( <i>ESRI</i> ) amplification is frequent in endometrial carcinoma and its precursor lesions. <u>J Pathol.</u> 2008 Oct;216(2):151-7.	Amp.: 23 % n = 176	FISH
<b>Tan, Lambros et al. 2008</b> <i>ESRI</i> amplification in endometrial carcinomas: hope or hyperbole? <u>J Pathol.</u> 2008 Nov;216(3):271-4.	siehe Kapitel 4.4.1	Diskussion
<b>Issa, Lebeau et al. 2009</b> Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. <u>Mod Pathol.</u> 2009 Feb;22(2):191-6.	Amp.: 2 % n = 243	FISH