

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Pathologisches Institut

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

## **Kombination der FISH- und TMA-Technik zur Aufklärung der molekularen Architektur des 8q21 Amplikons beim Mammakarzinom**

**Dissertation**

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

vorgelegt von:  
Josephine Berger  
aus Halle (Saale)

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 25.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. med. S. Mahner

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. rer. nat. R. Simon

Aus Dankbarkeit  
gewidmet meinen Eltern

Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.  
(Albert Einstein)

# **Inhaltsverzeichnis**

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung von Genamplifikationen für die Tumorentstehung .....	1
1.2 Mechanismen für Amplifikationen .....	2
1.2.1 Breakage-Fusion-Bridge Modell .....	3
1.2.2 Onion-Skin-Modell .....	4
1.3 Geschichtlicher Abriss über Methoden zur Identifizierung von Genamplifikationen...5	
1.3.1 Klassische Zytogenetik .....	5
1.3.2 Southern Blot .....	6
1.3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	6
1.3.4 PCR, RT-PCR.....	7
1.3.5 CGH und Microarrays.....	9
1.3.6 Zeittafel der Methoden zur Amplifikationsidentifikation.....	10
1.4 Stand der Forschung: 8q21 Amplifikation beim Mammakarzinom .....	11
1.5 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material .....	16
2.1.1 Der Tissue-Microarray und seine Herstellung.....	16
2.1.2 Mammakarzinom-Array .....	17
2.1.3 Mapping-Array 8q21 .....	17
2.1.4 Geräte .....	18
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Kultivierung von BAC-E. coli .....	19
2.2.2 pBAC-DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkeitskultur.....	21
2.2.3 DIG-Nicktranslation zur FISH-Sondenmarkierung.....	22
2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	22
2.2.5 Auswertung am Mikroskop.....	26
3 Ergebnisse .....	29
3.1 TMEM70 Amplifikation im Mammakarzinom (Mammakarzinom-Array) .....	29
3.1.1 8q21 Amplifikationshäufigkeit .....	29
3.1.2 Assoziation zu klinischpathologischen und molekularen Daten .....	29

3.1.3	Prognostische Relevanz der 8q21 Amplifikation .....	30
3.2	Kartierung des 8q21.3 Amplikons (Mapping-Array) .....	33
3.2.1	Ausdehnung des Amplikons .....	33
3.2.2	Abhängigkeit der Amplikon-Architektur vom Amplifikationstyp .....	34
3.2.3	Unterschiede im Amplifikationsniveau einzelner Gene .....	35
3.2.4	Bilder des Spots 4e.....	40
4	Diskussion.....	42
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis .....	54
7	Danksagung.....	68
8	Lebenslauf.....	69
9	Erklärung.....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 01 Mechanismus der intrachromosomalen Amplifikation (HSR-Typus).....	3
Abb. 02 Schematische Darstellung des Onion-Skin-Modells.....	4
Abb. 03 Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. ....	7
Abb. 04 Schematische Darstellung des Prinzips einer PCR.....	8
Abb. 05 Schematische Darstellung der Herstellung eines TMA.....	16
Abb. 06 Frisch entnommenes Tumorgewebe und fertiger Tissue-Microarray.....	16
Abb. 07 Beispielhafter Kontrollspot von TMEM70.....	27
Abb. 08 Beispielhaftes Cluster des Gens HNRNPA1P4.....	27
Abb. 09 Beispielhafte extrachromosomal amplifizierte Zelle des Gens TPD52.....	27
Abb. 10 Beispiel einer polysomen Zelle beim Gen PAG1.....	28
Abb. 11 Kaplan Meier Kurve bezogen auf Todesereignisse (Gesamtüberleben).....	31
Abb. 12 Kaplan Meier Kurve bezogen auf Todesereignisse (Gesamtüberleben).....	31
Abb. 13 Kaplan Meier Kurve bezogen auf das Auftreten von Rezidiven.....	32
Abb. 14 Kaplan Meier Kurve bezogen auf das Auftreten von Rezidiven.....	32
Abb. 15 Ausdehnung des 8q 21 Amplikons.....	33
Abb. 16 Anzahl der clusteramplifizierten Tumoren pro untersuchtem Gen.....	34
Abb. 17 Anzahl der extrachromosomal amplifizierten Tumoren pro untersuchtem Gen.....	35
Abb. 18 Schematische Darstellung eines Boxplots.....	36
Abb. 19 Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene aller untersuchten Tumoren des 8q21 Amplikons.....	37
Abb. 20 Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene des HSR-Typus vom 8q21 Amplikons.....	37
Abb. 21 Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene des DM-Typus vom 8q21 Amplikons.....	38
Abb. 22 Darstellung der Verteilung der Kopiezahlstärke für die einzelnen Gene des HSR- Typus vom 8q21 Amplikons.....	39
Abb. 23 Darstellung der Verteilung der Kopiezahlstärke für die einzelnen Gene des DM- Typus vom 8q21 Amplikons.....	40
Abb. 24 Photos des Spots 4e.....	41
Abb. 25 Übersicht über eine Reihe von CGH Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen am Chromosom 8q an Brustkrebszellen.....	43

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Sensitivität verschiedener Methoden zum Nachweis von Tumorzellen .....	8
Tab. 2 Zeittafel über die Einführung der Methoden zur Identifizierung von Amplifikationen .....	11
Tab. 3 Übersicht aller Gene im untersuchten Bereich. ....	15
Tab. 4 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mammakarzinom-Arrays.....	17
Tab. 5 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mapping-Array 8q21 .....	18
Tab. 6 Auflistung aller untersuchten Gene und ihrer zugehörigen Klone .....	20
Tab. 7 8q21 Amplifikation und klinischpathologische bzw. molekulare Daten in Brusttumoren.....	30

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
BFB	Break-Bridge-Fusion Modell
cDNA	complementary desoxynucleinacid
CEP	centromer enumeration probe
CGH	comparative genomic hybridization
DNA	desoxynucleinacid
DM	double minute
E. coli	Escheria coli
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HSR	homogeneously staining region
kD	Kilodalton
Mb	Megabasen
Mbp	Megabasenpaare
Min.	Minute
OT	Objekträger
PBS	Phosphate-Buffered Saline Working Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMID	Pubmed-Identifikationsnummer (Internetdatenbank)
RNA	Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SSC	saline sodium citrate
SNP	Single Nucleotide Polymorphismen
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue-Microarray
YAC	Yeast Artificial Chromosome

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Genamplifikationen für die Tumorentstehung

Ein Tumor besteht aus Zellen, die sich auf verschiedene Art und Weise einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen erworben haben. Je nach Krebsform liegt diesem eine andere Ursache zu Grunde. Derzeit sind unterschiedlichste Krebserzeuger, sogenannte Kanzerogene, bekannt. Bei fremdstoffbedingten Krebsformen sind aromatische Amine in der Farbenindustrie als Verursacher für das Auftreten von Harnblasenkrebs ein historisch bedeutsames Beispiel. Desweiteren ist unter strahleninduzierten Krebsformen die radioaktive Strahlung ein bekanntes Kanzerogen<sup>1</sup> und bei virusinduzierten Krebsformen ist beispielsweise das humanpathogene Papillomavirus als Auslösers für das Cervixkarzinom beschrieben worden.<sup>2</sup> Erhält die Zelle durch einen krebsauslösenden Mechanismus auf genetischer Ebene einen Wachstumsvorteil, sind dabei meist 3 Kategorien von Genen betroffen: die Onkogene, die Tumorsuppressorgene und die Reparatur-Mutator-Gene.<sup>3</sup> Zu den Mutationen, die solche Gene kanzerogen beeinflussen können, gehören vor allem Punktmutationen, Translokationen und Amplifikationen. Bei der Punktmutation kommt es zum Austausch einer Nukleinbase in der DNA, wogegen es bei der Translokation zur Verschiebung ganzer Chromosomenabschnitte kommt. Unter einer Genamplifikation versteht man die unplanmäßige extra- und intrachromosomale Vermehrung bestimmter Gene in der Zelle. Bei der Betrachtung im Mikroskop zeigt das zusätzliche genetische Material nicht die typische chromosomale Bandierung, sondern stellt sich, wenn es sich um extrachromosomales Material handelt, als Double-minute (DM), bzw. bei intrachromosomalem Material, als homogeneously staining region (HSR) dar. Diese Art der Mutation ist u. a. im Brustkrebs, als ein bedeutender Parameter der Tumorprogression und Tumorgenese durch Überexpression vieler zellulärer Onkogene, bekannt.<sup>4</sup> Amplifikationen können für die verschiedenen Zellen unterschiedliche Ergebnisse mit sich führen. Für die einen, könnte durch sie die Zelle in die Apoptose eintreten, anderen jedoch könnte aus ihnen ein Vorteil entstehen. So kann eine Genamplifikation der Tumorzelle beispielsweise die Möglichkeit geben mehr Mobilität zu erreichen, der Zellzykluskontrolle zu entgehen, Resistenzen gegen Tumormedikamente oder auch gegenüber dem Immunsystem zu entwickeln.<sup>5</sup> Besondere klinische Relevanz hat eine

Onkogenamplifikation dann, wenn sie ein unabhängiger Prognoseparameter für das Überleben des Patienten ist. Bei dem n-myc-Gen konnte diese Korrelation zwischen amplifiziertem Onkogen und signifikant aggressiverem Tumorwachstum erstmals gezeigt werden. So signalisiert eine n-myc Amplifikation beim Neuroblastom eine schlechte Prognose und stellt sich oft als therapieresistent dar.<sup>6</sup> Auch für das Mammakarzinom sind diverse prognoserelevante Amplifikationen beschrieben worden, unter anderem das in 15 – 20 % der Fälle amplifizierte Her2-Gen.<sup>7</sup>

## **1.2 Mechanismen für Amplifikationen**

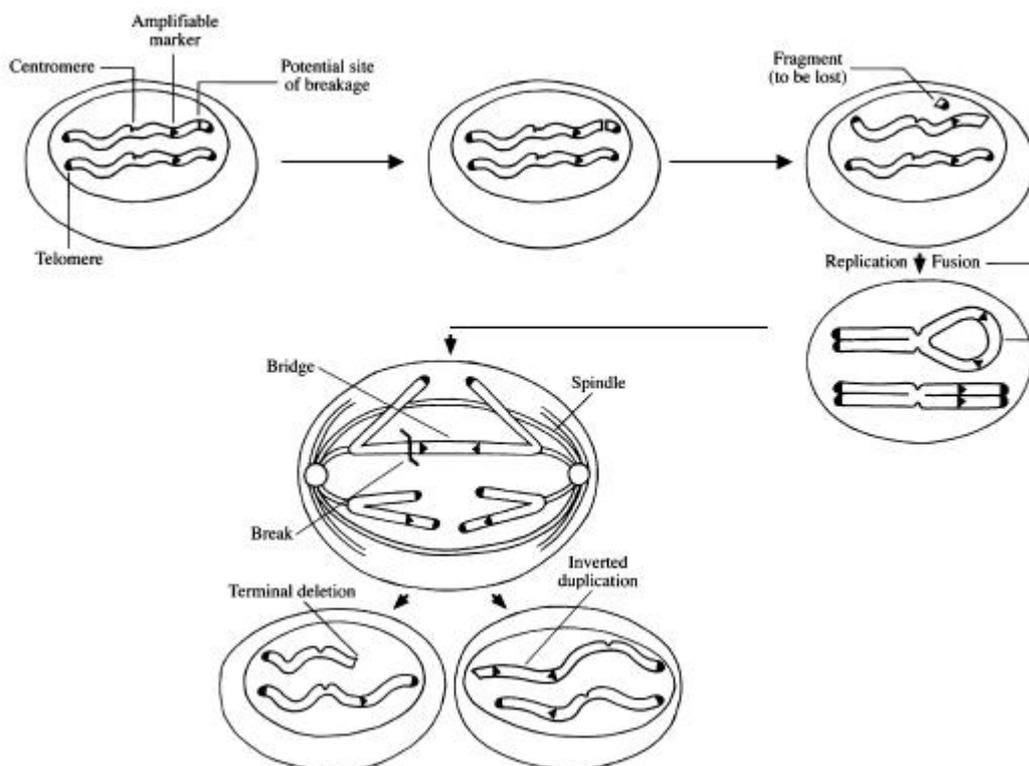
Über die Zeit sammeln sich durch verschiedene Einflüsse Fehler in der DNA unserer Zellen an. Gibt man der Zelle Zeit, kann sie fast jeden Fehler korrigieren. Zum Schutz des Erbgutes gibt es dafür die sogenannten Restriktionspunkte im Zellzyklus, welche für den Ersatz fehlerhaften Materials sorgen. Ein Problem besteht nur, wenn die Zelle sich trotz bestehender Fehler teilt, denn dann ist das Ausgangsprodukt der Replikation nicht ein normaler intakter, sondern ein defekter DNA-Doppelstrang. Nimmt das Replikationsenzym - DNA-Polymerase - anschließend wie gewohnt seine Arbeit auf, können dabei 3 Fälle eintreten:

1. Es baut willkürliche Nukleotide zur Überbrückung des Defekts ein, wodurch ein hohes Risiko für die Entstehung von Punktmutationen besteht.
2. Der Strang bricht vor der Läsion komplett, beim Versuch die Enden wieder zu verbinden kann es zu Deletionen, Inversionen und Translokationen kommen. Alternativ könnten Telomerasen das Chromosom auch zu zwei Chromosomfragmenten verarbeiten.
3. Wenn die DNA Synthese nach einer kurzzeitigen Pause fortgesetzt wird, wurde beobachtet, dass sich kleine Regionen des Genoms mit erhöhter Geschwindigkeit vermehren können. Dabei entstehen die sogenannten Amplifikationen der entsprechenden DNA Sequenz. Besonders zwei Modelle haben sich hervorgetan um diese Reaktion zu erklären: Das Breakage-Fusion-Bridge Modell und das Onion-Skin-Modell.<sup>8</sup>

Neben den beiden etablierten Mechanismen werden in der Literatur, unter anderem in dem Paper von Kurwahara, et al., aber viele alternative Wege zur Entstehung von Amplifikationen beschrieben.<sup>9</sup>

## 1.2.1 Breakage-Fusion-Bridge Modell

Eine Hypothese zur Erklärung von Amplifikationen ist das „Breakage-Fusion-Bridge (BFB) cycle model“, welches ursprünglich von B. McClintock vor mehr als 50 Jahren vorgeschlagen wurde.<sup>10</sup> Voraussetzung des BFB-Modells ist ein Telomerverlust. Telomere schützen die Enden eines Chromosoms und beugen Fusionen vor. Wird ein Chromosom mit Telomerverlust repliziert, können die Schwesterchromatiden fusionieren und bilden dabei eine lange Brücke. Während der Mitose wird diese wieder auseinandergerissen und es besteht die Gefahr, dass Genmaterial ungleichmäßig auf die Zellen verteilt wird.<sup>11</sup> Erfolgt dieser Mechanismus mehrfach hintereinander, kann eine Zelle eine Vielzahl von einem Gen akkumulieren.



**Abb. 1 Mechanismus der intrachromosomalen Amplifikation (HSR-Typus).** Nach einem Chromosomenbruch verbinden sich die zwei zusammengehörenden Schwesterchromatiden. In der Mitose werden sie vom Spindelapparat wieder von einander getrennt und dabei entsteht eine ungleichmäßige Verteilung des Genmaterials. Die Zelle mit Genverlust geht in Apoptose und die Zelle mit Gengewinn kann sich weitervermehren. Pipiras, E., et al., (1998). *Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome*. EMBO J.: 17(1): 325-33.

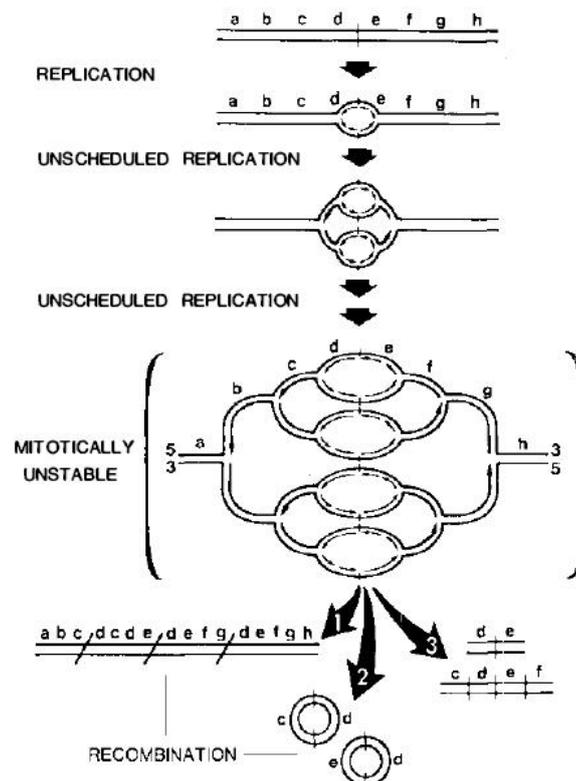
Die Zelle mit den akkumulierten Genen kann durch das zusätzliche Genmaterial einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen erlangen und jene Zelle ohne Kopie des betrachteten Gens würde in Apoptose gehen.<sup>12</sup>

Alle nötigen Schritte des BFB-Modells - chromosomaler Bruch,<sup>13</sup> Amplifikation durch Telomerverlust,<sup>14</sup> Fusion der Schwesterchromatiden und Bruch der Anaphasebrücken<sup>15</sup> - wurden in vivo bewiesen.

Am Ende des Modells steht eine Zelle mit intrachromosomal akkumuliertem Genmaterial - einer Amplifikation vom sogenannten HSR-Typus.

### 1.2.2 Onion-Skin-Modell

Die andere Hypothese für unplanmäßige DNA Replikationen ist das Onion-Skin-Modell. Dieses Modell ist eine Erklärung für die Entstehung der oben erwähnten Amplifikation vom DM-Typus. Hierbei wird eine instabile Gruppe von Replikationsgabeln innerhalb multipler DNA-Synthese-Zyklen produziert, deren Aussehen mit der namensgebenden Zwiebelschale verglichen werden kann.



**Abb. 2 Schematische Darstellung des Onion-Skin-Modells.** Durch Schleifenbildung entsteht extrachromosomal gelegenes Genmaterial – unter anderem die sogenannten double minutes. Stark G.R., Wahl G.M., (1984). *Gene amplification*. Annu Rev Biochem 53, p. 478.

In dieser Struktur bleiben nur die beiden Urstränge wirklich zusammenhängend, die anderen Replikationsgabeln sind zwar noch mit dem chromosomalen Urstrang verbunden,

haben aber regellos zufällige Endpunkte und liegen topologisch gesehen extrachromosomal. Abb. 2 zeigt eine ungeplante Synthese und Rekombination von DNA nach dem Onion-Skin-Modell. An der ersten entstandenen Blase finden weitere ungeplante Replikationen statt, was in einer verschachtelten Masse eines teilweise replizierten Mutterstrangs resultiert. Als Endergebnis dieses Prozesses kann es 1. zu einem intrachromosomalen Amplifikationsbereich durch multiple Rekombinationen oder 2. durch Rekombinationen in dem selbem Doppelstrangbereich zu extrachromosomalen Kreisen (double minutes) oder 3. zu linearen extrachromosomalen Genbereichen kommen.<sup>16</sup>

### ***1.3 Geschichtlicher Abriss über Methoden zur Identifizierung von Genamplifikationen***

#### **1.3.1 Klassische Zytogenetik**

Mit der Entdeckung der DNA im Jahre 1869 durch Friedrich Miescher, wurde der Grundstein aller Genomforschung gelegt. Der Anfang der Zytogenetik war durch Uneinigkeit über die korrekte Chromosomenanzahl geprägt. Um die Jahrhundertwende verwendete man sogenannte Mikrotomschnitte der Zellen, diese waren zu jener Zeit noch recht ungenau und deshalb war es sehr unwahrscheinlich, alle Chromosomen einer Zelle genau in einer Schnittfläche zu fixieren.<sup>17</sup> Deshalb schwankte die Chromosomenzahl zunächst sehr. 1912 gelang es Hans Winiwarter durch eine große histologische Arbeit die Chromosomenzahl für Frauen auf 48 und bei Männern auf 47 festzulegen.<sup>18</sup> 11 Jahre später korrigierte Theophilus Shickel Painter in einer Nachuntersuchung jenes Ergebnis für beide Geschlechter auf die Zahl 48.<sup>19</sup> 30 Jahre lang wurden 48 Chromosomen als allgemein gültige Lehrmeinung angesehen. Erst 1956 gelang es Joe Hin Tjio und Albert Levan, nach Einführung des hypotonen Schocks, die richtige Anzahl menschlicher Chromosomen auf 46 festzusetzen.<sup>20</sup> Durch die verbesserten Möglichkeiten der zytologischen Diagnostik wurde daraufhin eine Fülle von Anomalien der Chromosomen aufgezeigt. So zum Beispiel die Trisomie 21, als Ursache für das Down Syndrom,<sup>21</sup> oder auf dem Gebiet der Tumorzytogenetik das Philadelphia-Chromosom der chronischen myeloischen Leukämie.<sup>22</sup> Ein wesentlicher Fortschritt in der Zytogenetik zur Identifizierung struktureller Veränderungen stellte die Entwicklung der Q-Banden-

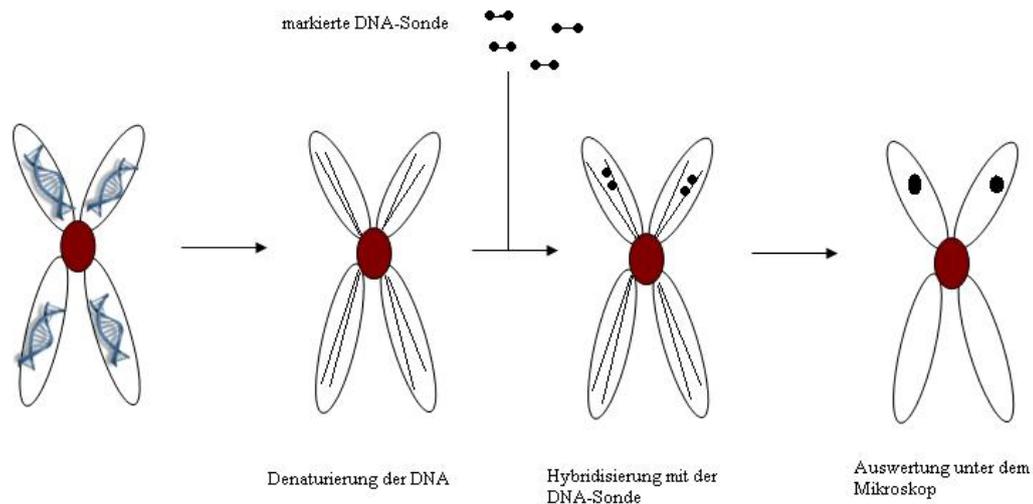
technik<sup>23</sup> dar. Durch diese Technik wurde erstmals die eindeutige Identifizierung der einzelnen Chromosomen möglich und damit auch die Diagnose struktureller Aberrationen.<sup>24</sup>

### **1.3.2 Southern Blot**

Die Untersuchungsmöglichkeiten der DNA wurden 1975, durch die von Edward Southern entwickelte Southern Blot Methode, erweitert. Mit diesem durchaus einfachen, aber sehr effektiven Verfahren, lässt sich in einem Gemisch von DNA eine bekannte DNA Sequenz nachweisen.<sup>25</sup> Hierfür wird die zu untersuchende DNA durch Restriktionsenzyme verdaut und per Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das entstandene Bandenmuster wird auf eine Membran übertragen (Blotten), fixiert und denaturiert. Anschließend lässt man markierte Sonden mit den verdauten DNA-Fragmenten hybridisieren<sup>26</sup> und macht sie in einem Autoradiogramm sichtbar.<sup>27</sup> Eine Anwendung dieser Technik besteht beispielsweise in der Lokalisierung einer cDNA auf genomischen YAC-Klonen.<sup>28</sup>

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

Jedes Molekül hat einen festen Platz in der Zelle. Extrahiert man das Molekül aus der Zelle, besteht immer die Gefahr des Informationsverlustes. Deshalb entwickelten Joe Gall und Mary Lue Pardue 1969 die In-situ-Hybridisierung.<sup>29</sup> Dieses Verfahren dient dem Nachweis chromosomaler Veränderungen. Dabei verwendet man Nukleinsäuresonden, um spezifische Nukleinsäuresequenzen innerhalb der Zelle oder direkt als Teil eines Chromosoms nachzuweisen. Mit der In-situ-Hybridisierung können, je nach Sonde und Untersuchungsziel, sowohl DNA- also auch RNA-Sequenzen lokalisiert werden. Wie Abb. 3 zeigt, nutzte man zum Nachweis von DNA-Sequenzen radioaktiv markierte Nukleinsäuresonden. Nach Trennung der DNA-Stränge wurden diese mit den Chromosomen hybridisiert und anschließend konnten die Bereiche, an die die markierte Sonde gebunden war, sichtbar gemacht werden. Heute findet vor allem die von Manning, et al. 1975 erstmals beschriebene nichtradioaktive Detektion mit Fluorochromen Anwendung.<sup>30</sup> Dadurch erhielt die Methode später den Namen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, welche die rasche Kartierung von Genen ermöglicht.



**Abb. 3 Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.** Angelehnt an Abb. aus: Wappler J. C. (2006). *Untersuchung somatischer Chromosomenveränderungen bei amyotropher Lateralsklerose*, Dissertation, Berlin, S. 37.

Die FISH-Analyse funktioniert aber nicht nur mit Einzelsonden, sondern kann auch mit einem Gemisch an unterschiedlichen Fluorochromen durchgeführt werden. Dabei sind vor allem die Multiplex-FISH (M-FISH) und die verwandte Spektral-Karyotypisierung erwähnenswert. Beide Ansätze ermöglichen die Darstellung aller Chromosomen in 24 verschiedenen Farben, welche anhand eines Computerprogramms verrechnet werden. Als Ergebnis erhält man dabei ein chromosomales Bandenmuster, mit welchem man komplexe Chromosomenveränderungen schneller und sicherer nachweisen kann, als mit den älteren Bänderungsanalysen.<sup>31</sup>

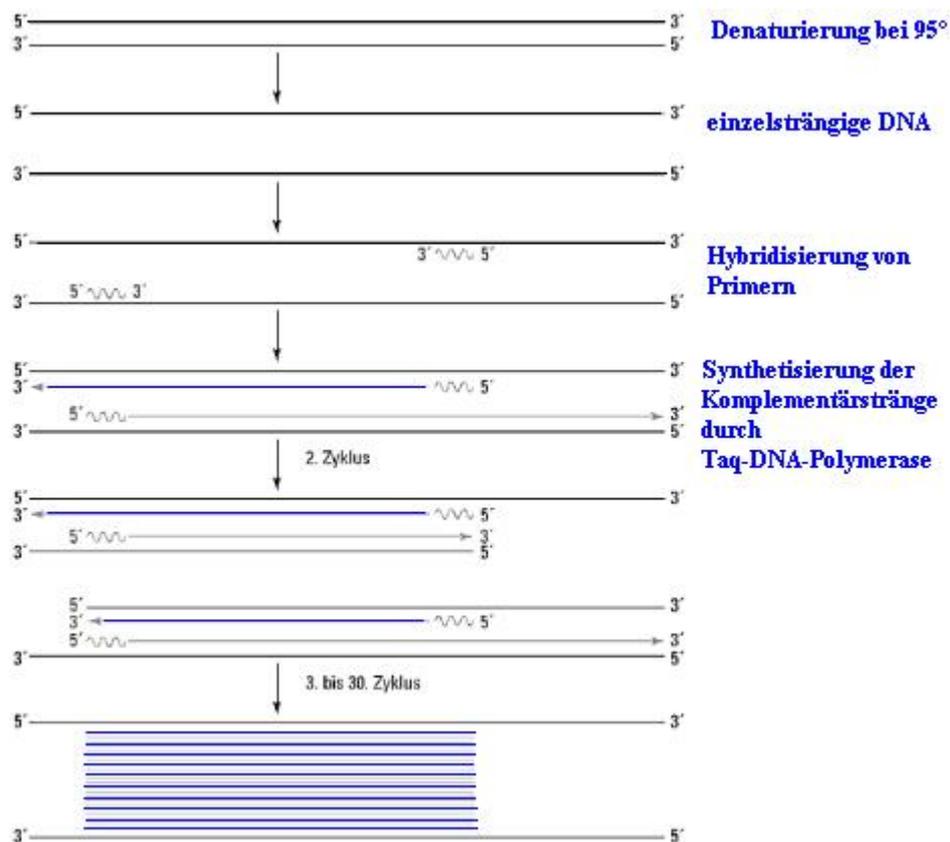
### 1.3.4 PCR, RT-PCR

Im Jahr 1983 gab es einen neuen Durchbruch in der molekularen Medizin. Der US-Amerikaner Kary Mullis entwickelte die Polymerasekettenreaktion.<sup>32</sup> Mit dieser Methode vermehrt man enzymatisch die bekannte Sequenz eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementären DNA-Strängen gebunden sind. Damit gelingt der Nachweis und die Vermehrung kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen.<sup>33</sup> Welche enorme Sensitivitätssteigerung die neue Methode mit sich brachte, zeigte Tab. 1 anhand des Nachweises von Tumorzellen.

Method	Detection of a malignant cell among „x“ normal cells
Classical cytogenetics	25
Metaphase-FISH (Sky)	100 - 300
Mikrosatelliten-PCR	100 - 10 000
Real-time-PCR	100 – 100 000

**Tab. 1 Sensitivität verschiedener Methoden zum Nachweis von Tumorzellen.** Hallbach J., 2006. *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 438.

Die PCR beginnt mit der Denaturierung der zu untersuchenden DNA durch Hitze bei 93-97°C. Dabei entstehen zwei Einzelstränge. Als nächstes wird die Temperatur abgekühlt und Primermoleküle können an die DNA binden, dieser Schritt nennt sich Annealing. Anschließend erhöht man die Temperatur auf etwa 72°C und lässt das thermostabile Enzym Taq-DNA-Polymerase die jeweiligen Komplementärstränge an die Ausgangs-DNA synthetisieren. Nach dieser Elongationsphase wird die Reaktion wieder auf die Schmelztemperatur erhitzt und ein neuer Zyklus beginnt.<sup>34</sup> Nach 20 Zyklen erhält man ca. 1 Million Kopien des gewünschten DNA-Abschnittes.<sup>35</sup>



**Abb. 4 Schematische Darstellung des Prinzips einer PCR.** Angelehnt an: Kulozik N.E., et al., 2000. *Molekulare Medizin Grundlagen – Pathomechanismen – Klinik*. 1. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter, 187.

Schnell entwickelte sich die PCR zu einem Standbein der Forschung und findet auf verschiedenen Gebieten ihre Anwendung.

Eine spezielle PCR-Anwendung ist die RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR). Sie wurde erstmals von Veres, et al. beschrieben.<sup>36</sup> Dies ist eine Methode zur Amplifikation von RNA. Da RNA der Taq-DNA-Polymerase nicht als Matrize dienen kann, wird zunächst eine reverse Transkription durchgeführt. Die erhaltene cDNA kann in einer nachfolgenden PCR selektiv amplifiziert werden. Damit lässt sich nachweisen, ob ein amplifiziertes Gen auch exprimiert wird.<sup>37</sup>

### **1.3.5 CGH und Microarrays**

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Amplifikationen ist die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).<sup>38</sup> Dieses Verfahren ermöglicht die Identifizierung von genomischen Imbalancen, dabei werden Zugewinne („gains“) und Verluste („losses“) von chromosomalem Material in einem Genom erfasst.<sup>39</sup> Bei der CGH wird verschieden markierte Tumor- und Referenz-DNA im Verhältnis 1:1 gemischt und mit einem Überschuss an Cot1-verdauter humaner DNA zur Absättigung hochrepetitiver Bereiche auf ein Metaphase-Präparat einer gesunden Kontrollperson hybridisiert. Dabei konkurriert die DNA um die homologen Bindungsstellen der Metaphasechromosomen. Das Ergebnis wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert. Die einzelnen Fluoreszenzintensitäten der Tumor- und Referenz-DNA werden aufgenommen und eine spezielle CGH Software ermittelt daraus einen CGH-Quotienten. Ein Fluoreszenzquotient von Tumor- zu Referenz-DNA über 1,25 bedeutet eine erhöhte Kopiezahl, ein Quotient unter 0,75 entspricht einem deletiertem Chromosomenabschnitt. Ein Wert zwischen 1,25 und 0,75 steht für einen balancierten Chromosomenstatus.<sup>40</sup> Der große Vorteil der CGH-Methode ist unbalancierte chromosomale Aberrationen nachzuweisen, auch wenn man keine Metaphasechromosomen präparieren kann, wie es häufig bei soliden Tumoren der Fall ist. Außerdem kann diese schnelle Methode auch an archiviertem Material erfolgen. Als Nachteil muss aber auf die Unfähigkeit balancierte Chromosomenaberrationen, wie z.B. Translokationen, zu detektieren, hingewiesen werden. Als Nachweisgrenze für Gewinne bzw. Verluste genomischen Materials sind 10 Mbp anzusehen, was circa einer Chromosomenbande entspricht.<sup>41</sup>

Man kann die Auflösung der chromosomalen CGH enorm verbessern, wenn man die Chromosomen durch DNA-Präparate mit definierten DNA-Sequenzen ersetzt. Dazu

wurden die seit Anfang der 1990er Jahre bekannten Microarrays entwickelt. Die teilweise auch als „Genchips“ oder „Biochips“ bezeichneten Träger, werden u. a. in Tissue-, Protein-, und DNA-Microarrays unterteilt. Mit Hilfe der sogenannten DNA-Microarrays lassen sich genomische Variationen, wie z.B. Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, untersuchen. Je nach Beschaffenheit der gebundenen Nukleinsäuren kann man hauptsächlich zwei Untergruppen der Nukleinsäure-Microarrays unterscheiden. Zum einen die Oligonukleotid-Microarrays, worauf kurze einzelsträngige DNA-Fragmente gebunden sind, und zum anderen die klassischen DNA-Microarrays mit einigen 100 bis 1000 gebundenen Basenpaaren. Die DNA Moleküle werden an definierte Positionen eines festgelegten Rasters auf einem Glasträger-Biochip aufgebracht.<sup>42</sup> Am bekanntesten ist hierbei die fotolithografisch gesteuerte Synthese von Oligonukleotiden direkt auf der Chipoberfläche.<sup>43</sup> Auf diesen Chips befinden sich untereinander angeordnete kurze Oligonukleotide, die sich in jeweils einer Base unterscheiden. Durchschnittlich ist jedes Gen durch 20-25 Oligos repräsentiert. So können auf einem 1,28 cm<sup>2</sup> großen Chip mindestens 12000 Gene immobilisiert werden.<sup>44</sup> Hierauf hybridisiert man ein fluoreszenzmarkiertes Genom-„Target“. Dieses Target kann sich, wegen der Hybridisierungseigenschaften kurzer Oligonukleotide, einzig an das komplett komplementäre Oligonukleotide binden. Durch die Anordnung der verschiedenen Oligonukleotidserien lässt sich jede Veränderung Base für Base genau detektieren.<sup>45</sup>

### **1.3.6 Zeittafel der Methoden zur Amplifikationsidentifikation**

1869	Entdeckung der DNA durch Miescher
1923	Painter legt die Chromosomenanzahl auf 48 fest
1956	Korrekte Darstellung eines menschlichen Chromosomensatzes, 46 Chromosomen werden bestimmt (Tjio, Levan)
1968	Caspersson entwickelt die Q-Bandentechnik
1969	Entwicklung erster Verfahren zur Sequenzanalyse (Dayhoff)
1969	In-situ-Hybridisierung von DNA-DNA und RNA-DNA wird durch J.R. Gall und M. L. Pardue beschrieben
1975	Southern entwickelt den Southern Blot
1986	Erfindung der Polymerasekettenreaktion zur enzymatischen Amplifizierung von Nukleotidsequenzen (Mulis u. Faloona)

1988	Beschluss der Initiative „Human Genome Project“ in den USA und Japan
1990	Entwicklung von Genchips zur parallelen Messung des Transkriptionszustandes ganzer Genome durch Hybridisierungsexperimente (Lehrach, et al.)
1992	Erstes Paper zur CGH (Kallioniemi, et al.)
1995	Erstes Microarray Paper (Shena, et al.)
2001	Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium)

**Tab. 2 Zeittafel über die Einführung der Methoden zur Identifizierung von Amplifikationen.**  
 Zusammengestellt aus: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg., 2008. *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, 62+99.

## **1.4 Stand der Forschung: 8q21 Amplifikation beim Mammakarzinom**

Genanomalien des Chromosoms 8 sind häufig und in verschiedenen soliden Tumoren, wie Prostata-, Ovarial-, Renal- und Blasentumoren, beschrieben worden.<sup>46</sup> Im Brustkrebs konnte mit Hilfe der CGH in vielen Studien besonders das Chromosom 8q als ein häufiges Ziel für Zugewinn und Verlust von Genmaterial bestimmt werden.<sup>47</sup> Speziell bei den höhergradigen Brusttumoren sind Zugwinne des langen Armes bekannt.<sup>48</sup> Schnell war klar, dass nicht einfach nur der Zugewinn des gesamten 8q-Armes das Tumorstadium beeinflusst, sondern man genau zwischen den einzelnen Genen differenzieren muss. Bereits die frühe CGH zeigte, selbst mit ihrer noch anfänglich sehr unpräzisen Auflösung, die Existenz unterschiedlich stark vermehrter Abschnitte auf. Deshalb versuchten die verschiedenen Arbeitsgruppen den Chromosomenarm weiter zu unterteilen und einen Tumorpromoter zu identifizieren. Als eines der ersten treibenden Gene wurde das MYC-Gen (8q24) identifiziert. Ein Gen, das Funktionen im Zellwachstum, im -metabolismus und in der -differenzierung sowie der Apoptose hat. Neben seiner Amplifikation in den verschiedensten Geweben konnte seine Überexpression und eine schlechte Überlebensprognose beim Brustkrebs gezeigt werden.<sup>49</sup> Schnell galt es als das verantwortliche Tumorgen des 8q-Armes. Doch je genauer die Untersuchungsmöglichkeiten mit der CGH wurden, umso klarer wurden Grenzen zu tumorrelevanten benachbarten Amplifikationsbereichen. So wurde 1998, neben dem längst bekannten 8q24 Locus, ein separater Abschnitt von 8q12-q22 beschrieben.<sup>50</sup> Durch die Korrelation zwischen Amplifikations- und Expressionsmustern wurden immer wieder neue potentielle Tumorgene identifiziert.<sup>51</sup>

Präziser wurde 8q21 unter anderem von C. Marchio, et al. untersucht, die in diesem Bereich 3 unabhängige Amplikons abgrenzten.<sup>52</sup> Auch V. Rodriguez, et al. identifizierten in ihrer Arbeit an einer SK-BR-3 Brustkrebszelllinie, unter der Verwendung von high-resolution BAC Array-CGH, 3 separate Amplikons in 8q21: Das Erste von 71,6 Mb bis 78,0 Mb, ein Zweites von 81,1 Mb bis 81,3 Mb und ein Drittes von 86,9 Mb bis 91,3 Mb.<sup>53</sup> In der mittleren Region ist das bekannte Gen Tumor Protein D52 (TPD52) und in der distalen dritten Region die Ubiquitin-Protein Ligase WWP1 gelegen, welchen bereits beiden klinische Relevanz eingeräumt wurde.<sup>54, 55</sup> Im Gegensatz dazu fehlen beim Brustkrebs aber Daten zur Prävalenz und klinischen Relevanz für das erste (proximale) Amplikon, in dem unter anderem die Gene LACTB2, TERF1, TCEB1, TMEM70 und ZFHX4 liegen (vgl. Tab. 3).

Als Grundstein der Arbeit ging eine Untersuchung von Paula Lassen voraus, in der bearbeitet wurde, welche prognostische Bedeutung der Amplifikation des Gens TMEM70 zugewiesen werden kann. Seine Relevanz unter den prognostischen Markern des Mammakarzinoms evaluierte Frau Lassen mithilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Dabei erhielt sie auf einem TMA von mehr als 2000 Brustkrebsproben eine TMEM70-Amplifikationsrate von 3 %. Jene amplifizierten Tumoren waren mit einer signifikant schlechteren Überlebensprognose als Tumoren ohne TMEM70-Amplifikation assoziiert. Außerdem beschrieb sie, dass dieser Zusammenhang unabhängig von der Amplifikation des sog. MYC Gen (8q24) ist.<sup>56</sup>

Der Bereich 8q21 unterteilt sich in 8q21.11, 8q21.12, 8q21.13, 8q21.2 und 8q21.3 mit einer Gesamtlänge von knapp 20 Megabasenpaaren und ca. 80 Genen. Die folgende Tab. 3 zeigt für den Bereich 71 Mb bis 92 Mb auf Chromosom 8q die enthaltenen Gene auf und weist darauf hin, welche Gene in der Literatur bereits als amplifiziert beschrieben worden sind.

Nummer	Genname	Mb	Genabschnitt	Quellenangabe
1	TRAM1	71	8q13.3	-
2	LACTB2	71	8q13.3	Rodriguez V., et al., (2007). <i>Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer.</i> Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.
3	XKR9	71	8q13.3	-
4	RP11-382J12.1	71	8q13.3	-
5	EYA1	72	8q13.3	-
6	RP11-1102P16.1	72	8q13.3	-
7	RP11-383H13.1	72	8q13.3	-

8	MSC	72	8q13.3	-
9	TRPA1	72	8q13.3	-
10	RP11-351E7.2	73	8q13.3	-
11	KCNB2	73	8q13.3	-
12	TERF1	73	8q21.11	-
13	C8orf84(RPESP)	74	8q21.11	-
14	RPL7	74	8q21.11	-
15	RDH10	74	8q21.11	-
16	STAU2	74	8q21.11	-
17	AC018620.11	74	8q21.11	-
18	UBE2W	74	8q21.11	-
19	TCEB1	74	8q21.11	Rodriguez V., et al., (2007). <i>Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer.</i> Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.
20	TMEM70	74	8q21.11	Choschick M., et al., (2010). <i>Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome.</i> Modern Pathology; 23(4): 603-610.
21	LY96	74	8q21.11	-
22	JPH1	75	8q21.11	-
23	GDAP	75	8q21.11	-
24	RP11758M4.1	75	8q21.11	-
25	PL15	75	8q21.11	-
26	CRISPLD1	75	8q21.11	-
27	HNFAG	76	8q21.11	-
28	RP11-65D13.1	77	8q21.11	-
29	ZFX4	77	8q21.11	Rodriguez V., et al., (2007). <i>Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer.</i> Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.
30	PEX2	77	8q21.11	-
31	PKIA	79	8q21.12	-
32	FAM164A	79	8q21.12	Hyman E., et al., (2002). <i>Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer.</i> Cancer Res; 62(21): 6240-6245.
33	IL7	79	8q21.12	-
34	STMN2	80	8q21.13	-
35	HEY1	80	8q21.13	-
36	MRPS28	80	8q21.13	-
37	TPD52	80	8q21.13	Balleine R.L., et al., (2000). <i>The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma.</i> Genes Chromosomes Cancer; 29:48-57.

				Pollack J.R., et al., (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. Proc Natl Acad Sci USA.1;99(20):12963-8.
38	ZBTB10	81	8q21.13	-
39	ZNF07	81	8q21.13	-
40	PAG1	81	8q21.13	-
41	FABP5	82	8q21.13	-
42	PMP2	82	8q21.13	-
43	FABP9	82	8q21.13	-
44	FABP4	82	8q21.13	-
45	FABP12	82	8q21.13	-
46	IMPA1	82	8q21.13	-
47	SLC10A5	82	8q21.13	-
48	ZFAND1	82	8q21.13	-
49	CHMP4C	82	8q21.13	-
50	SNX16	82	8q21.13	-
51	HNRNPA1P4	83	8q21.13	-
52	RLYL	85	8q21.2	-
53	LRRCC1	86	8q21.2	-
54	E2F5	86	8q21.2	Polanowska J., et al., (2000). <i>Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors.</i> Genes Chromosomes Cancer; 28: 126-130.  Pollack J.R., et al., (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. Proc Natl Acad Sci USA.1;99(20):12963-8.
55	CA13	86	8q21.2	-
56	C8orf59	86	8q21.2	-
57	RP11-219B4.5	86	8q21.2	-
58	RP11-219B4.6	86	8q21.2	-
59	CA1	86	8q21.2	-
60	CA3	86	8q21.2	-
61	CA2	86	8q21.2	-
62	REXO1L1	86	8q21.2	-
63	REXO1L2.P	86	8q21.2	-
64	ATPV0D2	87	8q21.3	-
54	PSKH2	87	8q21.3	-
66	SLC7A13	87	8q21.3	-
67	WWP1	87	8q21.3	Chen C., et al., (2007). <i>The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer.</i> Int. J. Cancer; 121: 80-87.  Yao J., et al., (2006). <i>Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast</i>

				<i>tumor progression. Cancer Res. 66(8):4065-78.</i>
68	FAM82B	87	8q21.3	-
69	CPNE3	87	8q21.3	-
70	CNGB3	87	8q21.3	-
71	CNBD1	87	8q21.3	-
72	DCAF4L2	88	8q21.3	-
73	MMP16	89	8q21.3	Rodriguez V., et al., (2007). <i>Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.</i>
74	RP11-37B2.1	90	8q21.3	-
75	RIPK2	90	8q21.3	-
76	OSGIN2	90	8q21.3	-
77	NBN	90	8q21.3	Pollack J.R., et al., (2002). <i>Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. Proc Natl Acad Sci USA.;99(20):12963-8.</i>
78	DECR1	91	8q21.3	-
79	CALB1	91	8q21.3	-
80	TMEM64	91	8q21.3	-
81	RP11-68L18.1	91	8q21.3	-
82	NECAB1	91	8q21.3	-
83	TMEM55A	91	8q21.3	-

**Tab. 3 Übersicht aller Gene im untersuchten Bereich (erzeugt mit Hilfe der „Ensemble-Plattform“).** Enthalten sind alle Gene inklusive des Pseudogenes HNRNPA1P4 (grau markiert). In grün sind alle Gene markiert, welche als Gensonden in der Untersuchung benutzt wurden. Bei Genen, für welche bereits eine Literaturangabe bezüglich einer Amplifikation im Brusttumor gefunden wurde, ist der betreffende Literaturverweis aufgeführt.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die bisher veröffentlichten Arbeiten deuten auf die Existenz von 3 verschiedenen, unabhängigen Amplifikationsloci auf Chromosom 8q21 hin. Für eines dieser Amplikons wurde das TMEM70 Gen als potentiell Kandidatengen beschrieben. Die Ausdehnung der Amplifikation und die hiervon betroffenen Gene sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Arbeit war es daher, Tumoren mit TMEM70-Amplifikation zu identifizieren und die proximale und distale Grenze des Amplikons durch eine Kartierung mit FISH-Proben in ca. 1 Megabasen-Intervallen zu bestimmen.

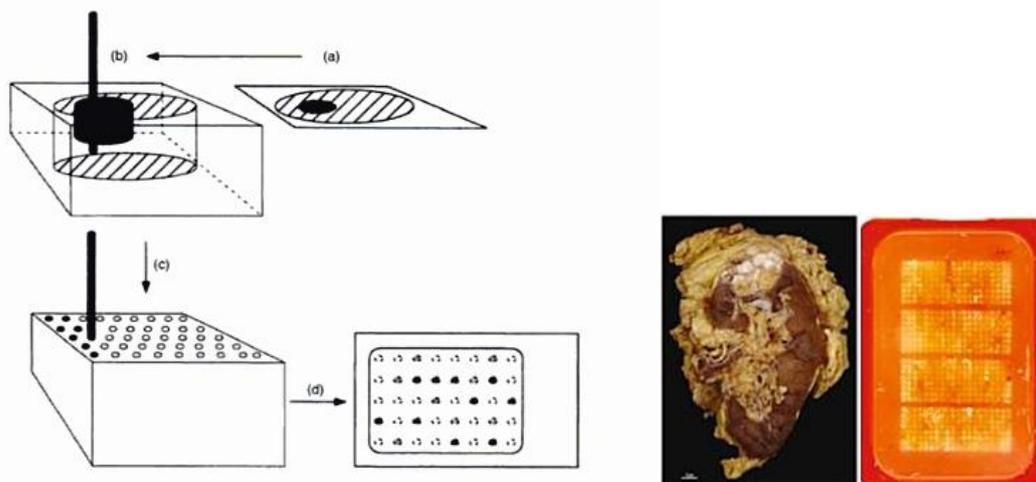
Zudem sollte der Amplifikationstypus (HSR- oder DM-Typus) bestimmt werden, um Rückschlüsse auf den Entstehungsmechanismus der Amplifikation zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Der Tissue-Microarray und seine Herstellung

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde mit einem so genannten Gewebe-Microarray (TMA) gearbeitet. Mit der Technik der Herstellung eines TMAs ist es möglich bis zu 1000 Proben definierter Tumorregionen in einen Paraffinblock einzubringen und damit später simultan auf einen Objektträger zu geben. Dadurch ist eine schnelle und kostensparende Bearbeitung einer großen Anzahl von Tumoren möglich. Diese Methode wurde ursprünglich entwickelt, um die Expression krankheitsrelevanter Kandidaten-Gene oder Genprodukte gleichzeitig in Hunderten von Gewebeproben untersuchen zu können. Des Weiteren findet sie aber heute beispielsweise auch in Qualitätskontrollen oder in der Entwicklung diagnostisch einsetzbarer Antikörper weitläufige Verwendung. Das nachfolgende Bild erklärt die Herstellung eines TMAs.



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Herstellung eines TMA:** Der Tumor (a) wird in Paraffin fixiert. Aus dem erstellten Block wird, aus dem vom Pathologen als relevant markierten Bereich (b), per Stanze ein Stück entnommen und in einen neuen Paraffinblock (c) gestanzt. Von diesem lassen sich dann dünnste Scheiben (d) zur Untersuchung auf einem Objektträger schneiden. Ye S., Day I.N.M., Hrsg. 2003. *Microarrays + Microplates: Applications in Biomedical Sciences*, 1. Auflage, Oxford: Bios Scientific Publ, 47.

**Abb. 6 Frisch entnommenes Tumorgewebe und fertiger Tissue-Microarray.** Ein Spot auf dem linken Bild entspricht einer Probe aus dem Tumor. Metaxas D., Axel L., Fichtinger G., Székely G., Hrsg. 2008. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention- MICCAI 2008 (LNCS 5242)*, Band 2, 1. Auflage, New York: Springer-Verlag, 3.

## 2.1.2 Mammakarzinom-Array

Der verwendete Mammakarzinom-Array (sog. Scotland-Array) ist ein Tissue-Microarray mit 849 Tumorproben. Diese setzen sich aus 814 verschiedenen Mammakarzinomen und 35 Kontrollgeweben zusammen.

Die Proben wurden zwischen dem 01.03.1995 und dem 17.12.2001 in Hamburg gesammelt. Im Durchschnitt waren die Patientinnen zum OP Datum 56,53 Jahre alt (Range: 27 - 91).

<b>Mammakarzinom-Array</b>		<b>n=849</b>
	<b>Histologie</b>	
	+ duktal	+ 501
	+ lobulär	+ 249
	+ tubullär	+ 33
	+ medullär	+ 13
	+ mucinös	+ 12
	+ papillary	+ 4
	+SQCC	+2
	<b>Tumorstadium</b>	
	+ pT1	+ 464
	+ pT2	+ 286
	+ pT3	+ 44
	+ pT4	+ 20
	<b>Nodalstatus</b>	
	+ pN0	+ 544
	+ pN1	+ 244
	+ pN2	+ 26
	<b>Metastasenstatus</b>	
	+ pM0	+ 802
	+ pM1	+ 12
	<b>histologischer Differenzierungsgrad</b>	
	+ G1	+ 166
	+ G2	+ 524
	+ G3	+ 123
<b>Kontrollen</b>		35

Tab. 4 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mammakarzinom-Arrays

## 2.1.3 Mapping-Array 8q21

Der entwickelte Mapping-Array „8q21“ setzt sich aus 13 TMEM 70 amplifizierten Spots des oben beschriebenen Mammakarzinom-Array und 15 Kontrollgeweben zusammen. Die Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Operation ein Durchschnittsalter von 51,11 Jahren

(Range: 27 – 62 Jahre). Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung des Array gibt die nachfolgende Tab. 5 wieder.

<b>Mapping-Array 8q21</b>		<b>n=28</b>
	<b>Histologie</b> + duktal + medullär	+ 13 + 0
	<b>Tumorstadium</b> + pT1 + pT2 + pT3 + pT4	+ 1 + 10 + 2 + 0
	<b>Nodalstatus</b> + pN0 + pN1 + pN2	+ 5 + 8 + 0
	<b>Metastasenstatus</b> + pM0 + pM1	+ 12 + 1
	<b>histologischer Differenzierungsgrad</b> + G1 + G2 + G3	+ 0 + 7 + 6
Kontrolle		15

Tab. 5 Zusammensetzung und Eigenschaften des Mapping-Array 8q21

#### 2.1.4 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Arbeit im Labor verwendet:

- PTC-100™ Programmable
- Thermomixer 5436 von Eppendorf
- Thermal Controller von MJ Research
- Centrifuge 5424 von Eppendorf
- Wasserbad: Typ 1083 von GFL
- ThermoBrite™ von Abbott Molecular
- Mikroskop „Axio Scope A.1“ von Zeiss

## 2.2 Methoden

Die praktische Arbeit der Doktorarbeit setzt sich aus drei großen Themenbereichen zusammen:

- a) Bakterienanzucht, DNA Extraktion, DIG-NICK-Translation
- b) Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
- c) Auswertung per Fluoreszenz Mikroskop

Im Folgenden werden für die einzelnen Schritte die Laborprotokolle wiedergegeben.

### 2.2.1 Kultivierung von BAC-E. coli

Verwendete Materialien:

- pBAC-E.coli-Klone :

Gen Name	Produkt Nummer	Produkt Name	Klongröße
TRAM1, LACTB2, XKR9	RPCIB753J12382Q	RP11-382J12	71,49-71,61
TRPA1	RPCIB753H13383Q	RP11-383H13	72,94-73,01
RPESP, TERF1, KCNB2	RPCIB753A24531Q	RP11-531A24	73,82-73,99
STAU2, AC018620.11	RPCIB753D18181Q	RP11-181D18	74,30-74,42
STAU2	RPCIB753D19463Q	RP11-463D19	74,53-74,68
UBE2W, TCEB1	RPCIB753C13559Q	RP11-559C13	74,70-74,87
TMEM70, LY96	RZPDB737E022003D	RP11-6I2	74,91-75,04
GDAP1, JPH1	RPCIB753K13503Q	RP11-503K13	75,08-75,17
CRISPLD1	RPCIB753C10626Q	RP11-626C10	75,82-76,00
ZFHX4	RPCIB753I10112Q	RP11-112I10	77,62-77,80
C8orf70(FAM164A)	RPCIB753O24578Q	RP11-578O24	79,56-79,63

TPD52	RPCIB753K1592Q	RP11-92K15	80,93-81,10
PAG1	RPCIB753E10172Q	RP11-172E10	81,93-81,96
HNRNPA1P4	RPCIB753C08426Q	RP11-426C8	83,19-83,34
E2F5,CA13,LRRCC1, C8orf59	RPCIB753B04219Q	RP11-219B4	86,04-86,17
WWP1	RZPDB737F072129D	RP11-459L5	87,35-87,44
MMP16	RPCIB753D06480Q	RP11-480D6	89,13-89,18
OSGIN2, NBN	RPCIB753H1296Q	RP11-96H12	90,84-90,86
TMEM55A,NECAB1	RPCIB753N11409Q	RP11-409N11	91,94-92,07

**Tab. 6 Auflistung aller untersuchten Gene und ihrer zugehörigen Klone**

- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (25g/1 dH<sub>2</sub>O); autoklaviert
  - Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.)
1. 10 ml Medium in 100 ml Erlmeyerkolben füllen
  2. 30 µl Chloramphenicol dazugeben
  3. Bakterien
    - a. E. coli per abgeflammter Pinzette mit autoklaviertem Zahnstocher von Stabstockoberfläche abkratzen und in den Kolben werfen bzw.
    - b. 10 µl E. coli aus einem bei -80 °C gelagertem Glycerolstock pipettieren und in den Kolben abwerfen.
  4. Kolben für 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm auf Schüttelinkubator inkubieren.
  5. 12 µl von der angeimpften Kultur in neuen 100 ml Erlmeyerkolben zu 12 ml Medium und 36 µl Chloramphenicol geben.
  6. Kolben erneut für 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm auf Schüttelinkubator inkubieren.
  7. DNA-Extraktion

## **2.2.2 pBAC-DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkeitskultur**

Die DNA-Extraktion wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma QIAGEN durchgeführt. Alle dafür benötigten Reagenzien waren in diesem Kit enthalten. Das mitgelieferte Protokoll wurde leicht verändert und wie folgt durchgeführt.

1. 4 ml ( $2 \times 2$  ml) einer ausreichend dicht gewachsenen pBAC-E. coli-Kultur im 2 ml Eppendorf-Röhrchen in Tischzentrifuge pelletieren (2 Min., ca. 14.000 rpm ( $\sim 18.000 \times g$ ), evtl. Mediumreste mit Pipette abnehmen)
2. Pellet in 250  $\mu$ l Puffer P1 (20 ml P1 + 200  $\mu$ l (10 mg/ml) RNase A) vollständig resuspendieren
3. 250  $\mu$ l Puffer P2 zur Suspension hinzufügen und vorsichtig 8 – 12  $\times$  invertieren
4. 350  $\mu$ l Puffer N3 hinzufügen und sofort vorsichtig 8 – 12  $\times$  invertieren
5. 30 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
6. Überstand in eine „QIAprep spin“-Säule (in einem „2 ml collection tube“) überführen
7. 1 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
8. Durchfluss verwerfen
9. „QIAprep spin“-Säule mit 500  $\mu$ l Puffer PE beladen und 1 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
10. Durchfluß verwerfen
11. „QIAprep spin“-Säule erneut mit 500  $\mu$ l Puffer PE beladen und 1 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
12. Durchfluss verwerfen
13. erneut 1 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
14. Durchfluss und „2 ml collection tube“ verwerfen
15. „QIAprep spin“-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen setzen
16. „QIAprep spin“-Säule mit 50  $\mu$ l 70°C warmen EB beladen (Elution-Buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
17. 1 Min. inkubieren (RT)
18. 1 Min. bei ca. 14.000 rpm in der Tischzentrifuge ( $\sim 18.000 \times g$ ) zentrifugieren
19. Quantifizierung der DNA per Nanodrop

### **2.2.3 DIG-Nicktranslation zur FISH-Sondenmarkierung**

Alle Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden mit dem „Nick Translations System“ von Invitrogen selbst hergestellt.

Nach eigenem modifiziertem Protokoll wurde zunächst ein Gesamtansatz mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

In 0,5 ml Eppendorfröhrchen (auf Eis):

5 µl dNTP-Mix ohne dTTP	(0,2 mM je Nukleotid)
1 µl Digoxigenin-dUTP	(1 mM, „Roche“)
x µl pBAC-DNA-Lösung	(entsprechend ca. 2 µg, höchstens 38 µl)
x µl dH <sub>2</sub> O	(zu 38µl pBAC-DNA-Lösung fehlendes Volumen)
5 µl Pol I-DNase-Mix	(0,5 U/µl Pol I, 0,4 mU/µl DNaseI)
1 µl Pol I	(10 U/µl, „Invitrogen“)

---

50 µl

Diesen Ansatz vortexen, zentrifugieren und anschließend 90 Min. bei 15 °C auf dem Thermocycler inkubieren.

Danach erneute Zugabe von 5 µl Pol I-DNase-Mix in jeden Tub und weitere Inkubation für 15 Min. auf dem Thermocycler. Abschließend 5 µl Stop-Puffer (0,5 M EDTA, pH 8,0) hinzufügen. Alle Tubes vortexen und zentrifugieren.

### **2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

#### **2.2.4.1 Entparaffinierung, Pretreatment und proteolytische Vorbehandlung**

Für die FISH-Analyse wurden sowohl 4 µm dicke Schnitte des Scotland-Array als auch des angefertigten Mapping-Arrays verwendet. Diese wurden zunächst entparaffiniert und nach dem Protokoll des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) proteolytisch vorbehandelt.

Verwendete Materialien:

- Destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O)
- Ethanol (70 % / 80 % / 96 % )
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01 NHCL) (Vysis)
- Xylol

- (1) TMA-Schnitte 3 ×10 Min. ins Xylol stellen
- (2) 2 × 5 Min. in Ethanol (95 %) stellen
- (3) 3 Min. auf Heizplatte(48 °C) lufttrocknen
- (4) 15 Min. in 80 °C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
- (5) 2 Min. in dH<sub>2</sub>O waschen
- (6) 150 Min. in 37 °C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
- (7) 2 Min. in dH<sub>2</sub>O waschen
- (8) 3 Min. in Ethanol (70 %) stellen
- (9) 3 Min. in Ethanol (80 %) stellen
- (10) 3 Min. in Ethanol (96 %) stellen
- (11) 3 Min. auf Heizplatte (48 °C) lufttrocknen

#### **2.2.4.2 Hybridisierung**

Die Hybridisierung erfolgt mit den in Tab. 6 aufgeführten genspezifischen Sonden und der Zentromersonde CEP 8 (D872) Spectrum Orange™ von Abbott.

Zunächst wird ein Basis-Hybridisierungsmix hergestellt:

Verwendete Materialien

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

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

3,5 µl der selbst hergestellten Sonde werden daraufhin mit 2 µl Cot-DNA und 10,5 µl Basis-Hybridisierungsmix sowie 4 µl CEP 8 zu einem Hybridisierungsmix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verdünnt.

Daraufhin erfolgt die Hybridisierung nach folgendem Protokoll:

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

Als nächsten Schritt die TMA-Schnitte stringent waschen:

Verwendete Materialien

- 2 × SSC
  - 1 x PBS (2 g KCl, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl, 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 800 ml H<sub>2</sub>O)
  - NP40
1. TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbercement und Deckgläschen entfernen
  2. Schnitte in Waschpuffer (2 × SSC; 0,3 % NP 40) bei Raumtemperatur stellen
  3. Schnitte 2 Min. bei 72 °C im Waschpuffer (2 × SSC; 0,3 % NP 40) waschen
  4. Schnitte kurz in 1x PBS waschen
  5. Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

### 2.2.4.3 FISH-Enhancer-Kit-Detektion

Mit dem Roche „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ wurden die Digoxigeninrester der selbsthergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Dies geschah entsprechend nachstehendem Protokoll:

#### Verwendete Materialien

- PBS
- Antikörper
  - Anti-Digoxigenin, mouse IgG1 von Roche
  - Sheep anti-mouse Ig, F(ab')<sup>2</sup> Digoxigenin conjugate von Millipore
  - Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments (from sheep) von Roche
- Blockingsolution

1. Blockingsolution und PBS im Verhältnis 10:1 mischen
2. OT mit 500 µl 1 × Blocking-Solution eindecken (ohne Deckgläschen), 45 Min. bei RT inkubieren
3. Blockingsolution abkippen
4. Antikörperaliquots vor Verdünnung mit Blocking-Lösung 5 Min. bei ca. 10.000 rpm zentrifugieren.
5. 50 µl Maus-Anti-DIG-AK-Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit-Tube #1 in 48 µl 1 × Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 75 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren.
6. 3 × mit 100 ml Waschpuffer (1 × PBS, 0,2 % Tween 20) bei 37 °C waschen (kurz nacheinander- je etwa 1 Min. - in 3 Küvetten mit 1 × PBS, 0,2 % Tween 20 und 37 °C stellen (Wasserbad)).
7. 50 µl Anti-Maus-AK-DIG-Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit-Tube #2 in 48 µl 1 × Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 75 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren.

8. 3 × mit 100 ml Waschpuffer (1 × PBS, 0,2 % Tween20) bei 37 °C waschen (kurz nacheinander- je etwa 1 Min. - in 3 Küvetten mit 1 × PBS, 0,2 % Tween 20 und 37 °C stellen (Wasserbad)).
9. 50 µl Anti-DIG-Flourescein-Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit-Tube #3 in 48 µl 1 × Blocking) auf OT pipettieren, mit Parafilm abdecken (evtl. Luftbläschen herausstreichen) und 75 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren (Antikörper und eingedeckte OT dunkel halten).
10. 3 × 5 Min. mit 100 ml Waschpuffer (1 × PBS, 0,2 % Tween 20) waschen (jeweils nacheinander 5 Min. in 3 Küvetten mit 1 × PBS, 0,2 % Tween 20 und 37 °C (Wasserbad) stellen, Küvetten dunkel halten (geschlossenes Wasserbad oder dunkler Raum) )
11. Lufttrocknen der OT im Dunkeln (in trockener Kammer im Schrank, dunklen Raum) bei RT
12. Eindecken der luftgetrockneten OT mit 50 µl DAPI-Antifade, mit Deckgläschen (24×32 mm) abdecken, möglichst dunkel halten.

### **2.2.5 Auswertung am Mikroskop**

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines „Axio Scope A.1“ Mikroskop von Zeiss. Für jede Sonde wurden durch Zählen von mindestens 20 Zellkernen die Genkopiezahl und die Zentromersignalezahl pro Spot bestimmt.

Eine Amplifikation wurde dann angenommen, wenn mindestens 2 × so viele Gen- wie Zentromersignale gezählt wurden (Ratio von Gen zu Cep 8 > 2,0). Wenn mehr Gen- als Zentromersignale vorhanden waren, jedoch weniger als zweifach, wurde die Genkopiezahl des entsprechenden Tumors als „Zugewinn“ (Gain) (Ratio > 1,0 aber < 2,0) klassifiziert. Alle anderen Proben mit Ratio = 1,0 wurden als „nicht amplifiziert“ gewertet. Die Ergebnisse wurden tabellarisch festgehalten.

### 2.2.5.1 Normaler Spot

Als normal wurde ein Spot dann betrachtet, wenn die Zellen 2 Gensignale und 2 Zentromersignale zeigten.

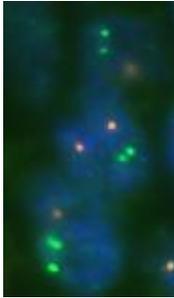


Abb. 7 Beispielhafter Kontrollspot von TMEM70

### 2.2.5.2 Cluster Amplifikation

Zeigten sich in einer Zelle deutlich mehr Gensignale als Zentromersignale und waren die Gensignale in einem Bereich der Zelle gruppiert zu sehen, wurde diese Zelle als Cluster Amplifikation gewertet.

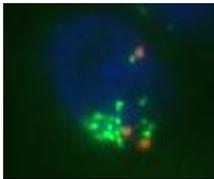


Abb. 8 Beispielhaftes Cluster des Gens HNRNPA1P4

### 2.2.5.3 Extrachromosomale Amplifikation

Neben den zuvor gezeigten Cluster-Amplifikationen gab es ebenso eine Vielzahl extrachromosomal amplifizierter Spots. Hierbei sieht man eine deutliche Vermehrung der Gensignale im Vergleich zu den Zentromersignalen. Die Gensignale liegen willkürlich in der Zelle verteilt.



Abb. 9 Beispielhafte extrachromosomal amplifizierte Zelle des Gens TPD52

#### 2.2.5.4 Polysomie

Als Polysomie bezeichnet man das Auftreten mehrerer homologer Chromosomen, statt den zwei normalerweise vorhandenen. Dies spiegelt sich bei der Auswertung in mehr als zwei Gen- und Zentromersignalen wieder. Die Ratio ist in diesen Spots  $> 1$  aber  $< 2$ .

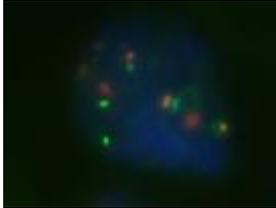


Abb. 10 Beispiel einer polysomen Zelle beim Gen PAG1

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *TMEM70* Amplifikation im Mammakarzinom (Mammakarzinom-Array)

##### 3.1.1 8q21 Amplifikationshäufigkeit

Nach erfolgreicher Sondenherstellung von *TMEM70* wurden die beiden Slides des Mammakarzinom-Arrays mit der Sonde inkubiert. Die Auswertung unter dem Mikroskop ergab, bei einer durchschnittlichen Auswertbarkeit von 62,53 %, eine Amplifikationsrate des Gens *TMEM70* von 2,75 % unter allen histologischen Typen. Amplifikationen kamen nur beim Mammakarzinom vom duktalem Typ vor und machten dort 4,26 % aus. Die zugehörigen Blöcke der Tumore wurden anschließend für den Mapping-Array herausgesucht und hatten die in Tab. 5 beschriebenen Eigenschaften. Neben den Amplifikationen gab es auch noch eine Reihe anderer Spots mit veränderter Kopiezahl: Gain 26 (5,11 %) und Polysomie 80 (15,72 %).

##### 3.1.2 Assoziation zu klinischpathologischen und molekularen Daten

Die Auswertung des Mammakarzinom-Array zeigte, dass alle amplifizierten Spots duktaler Genese waren. Unter den anderen histologischen Typen konnte keine Amplifikation gefunden werden. Die *TMEM70* Amplifikation wurde mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ( $p = 0,0243$ ) und einem fortgeschrittenen Lymphknotenstatus ( $p = 0,0314$ ) assoziiert. Zum Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor sowie zu HER2 konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

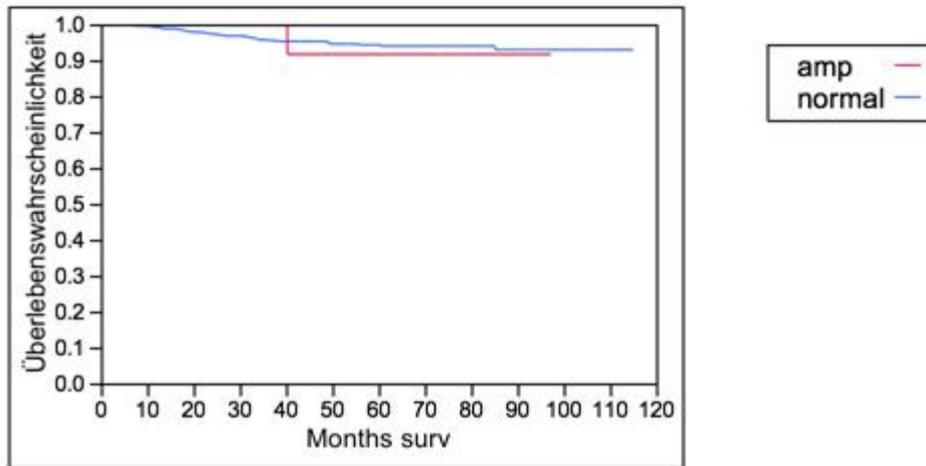
		n all	n analysierbare 8q21 (%)	Status der 8q21 Amplifikation				p-Wert
				Normale (%)	Polysomie (%)	Gain (%)	Amplifikation (%)	
All samples		814	509 (62,53)	389 (76,42)	80 (15,72)	26 (5,11)	14 (2,75)	
Histological type	Ductal	501	329 (65,67)	243 (73,86)	55 (16,72)	17 (5,17)	14 (4,26)	
	Lobular	249	147 (59,04)	118 (80,27)	23 (15,65)	6 (4,08)	0 (0)	
	Tubulary	33	17 (51,52)	16 (94,12)	0 (0)	1 (5,88)	0 (0)	
	Medullary	13	8 (61,54)	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25)	0 (0)	
	Mucinous	12	5 (41,67)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Papillary	4	2 (50)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	
	SQCC	2	1 (50)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Tumor stage	pT1	464	260 (56,03)	209 (80,38)	37 (14,23)	13 (5)	1 (0,38)	<b>0,0243</b>
	pT2	286	204 (71,33)	147 (72,06)	34 (16,67)	12 (5,88)	11 (5,39)	
	pT3-4	64	45 (70,31)	33 (73,33)	9 (20,00)	1 (2,22)	2 (4,44)	
Nodal stage	pN0	544	332 (61,03)	264 (79,52)	46 (13,86)	17 (5,12)	5 (1,51)	<b>0,0314</b>
	pN+	270	177 (65,55)	125 (70,62)	34 (19,20)	9 (5,08)	9 (5,08)	
Grading	G1	166	89 (53,61)	73 (82,02)	13 (14,61)	3 (3,37)	0 (0)	0,0668
	G2	524	329 (62,79)	254 (77,2)	49 (14,89)	18 (5,47)	8 (2,43)	
	G3	123	90 (73,17)	61 (67,78)	18 (20)	5 (5,56)	6 (6,67)	
ER IHC allred score	0-2	158	88 (55,70)	69 (78,41)	11 (12,5)	4 (4,55)	4(4,55)	0,3774
	3-4	14	9 (64,29)	7 (77,78)	0 (0)	2 (22,22)	0 (0)	
	5-6	79	41 (51,90)	34 (82,93)	4 (9,76)	2 (4,88)	1 (2,44)	
	7-8	534	359 (67,22)	270(75,21)	62 (17,27)	18 (5,01)	9 (2,51)	
Her2 (IHC)	0	401	234 (58,35)	183 (78,21)	36 (15,38)	9 (3,85)	6 (2,56)	0,4844
	1	213	151 (70,89)	114 (75,5)	25 (16,56)	8 (5,3)	4 (2,65)	
	2	58	45 (77,59)	33 (73,33)	9 (20)	3 (6,67)	0 (0)	
	3	73	53 (72,60)	39 (73,58)	6 (11,32)	4 (7,55)	4 (7,55)	

**Tab. 7 8q21 Amplifikation und klinischpathologische bzw. molekulare Daten in Brusttumoren**

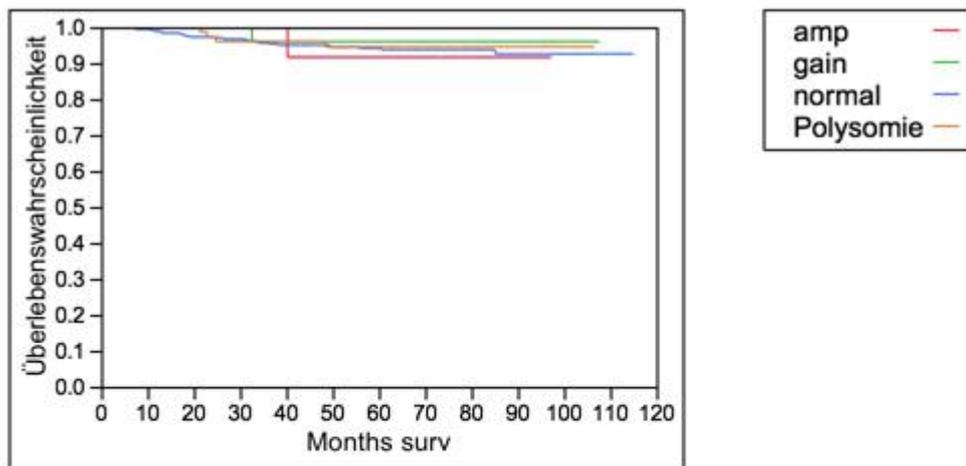
### **3.1.3 Prognostische Relevanz der 8q21 Amplifikation**

Bei der Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Brustkrebs, deren Zellen 8q21 amplifiziert waren, im Vergleich zu jenen ohne Amplifikation, konnte sowohl bezogen zum Ereignis des Todes als auch dem Auftreten eines Rezidivs kein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14).



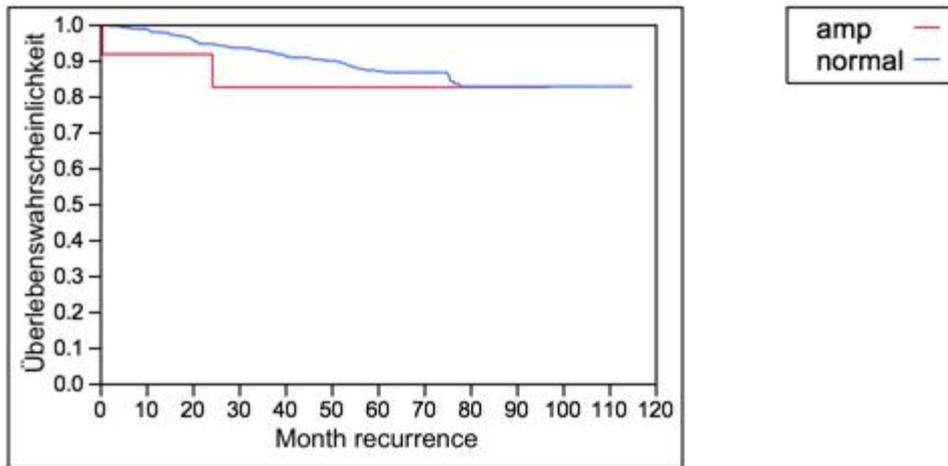
Gruppe	n alle	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	p Wert
amp	14	1	13	40.274	0.7939
normal	494	28	466	81.8099	
Kombiniert	508	29	479	81.8015	

**Abb. 11 Kaplan Meier Kurve bezogen auf Todesereignisse (Gesamtüberleben),** die rote Linie steht für Amplifikation; die Blaue stellt eine Zusammenfassung aller Spots, die sich als Polysomie, Gain oder Normal zeigten, dar.



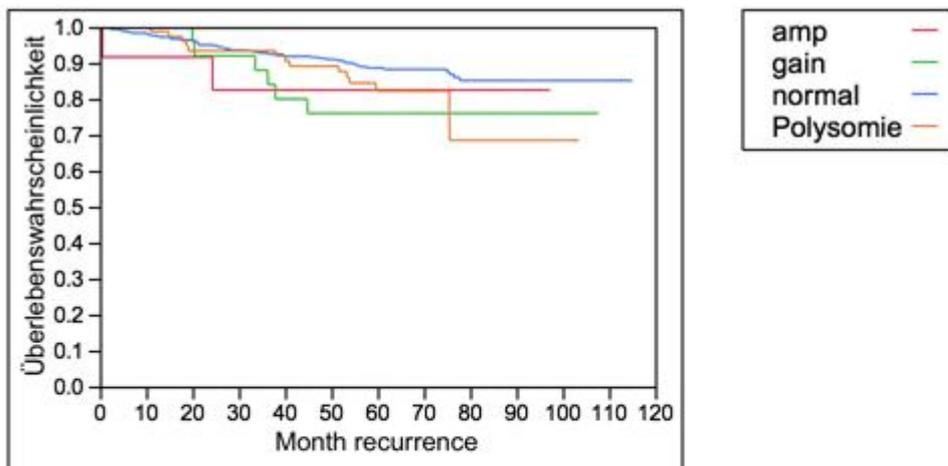
Gruppe	n alle	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	p Wert
amp	14	1	13	40	0.957
gain	26	1	25	33	
normal	388	23	365	82	
Polysomie	80	4	76	47	
Kombiniert	508	29	479	82	

**Abb. 12 Kaplan Meier Kurve bezogen auf Todesereignisse (Gesamtüberleben),** die rote Linie steht für Amplifikation, orange für Polysomie, grün für Gain und blau für normale Spots.



Gruppe	n alle	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	p Wert
amp	13	2	11	22	0.7122
normal	487	64	423	72	
Kombiniert	500	66	434	71	

**Abb. 13 Kaplan Meier Kurve bezogen auf das Auftreten von Rezidiven**, die rote Linie steht für Amplifikation; die Blaue stellt eine Zusammenfassung aller Spots, die sich als Polysomie, Gain oder Normal zeigten, dar.



Gruppe	n alle	Anzahl ausgefallen	Anzahl zensiert	Mittelwert	p Wert
amp	13	2	11	22	0.1732
gain	26	6	20	42	
normal	382	44	338	72	
Polysomie	79	14	65	69	
Kombiniert	500	66	434	71	

**Abb. 14 Kaplan Meier Kurve bezogen auf das Auftreten von Rezidiven**, die rote Linie steht für Amplifikation, orange für Polysomie, grün für Gain und blau für normale Spots.

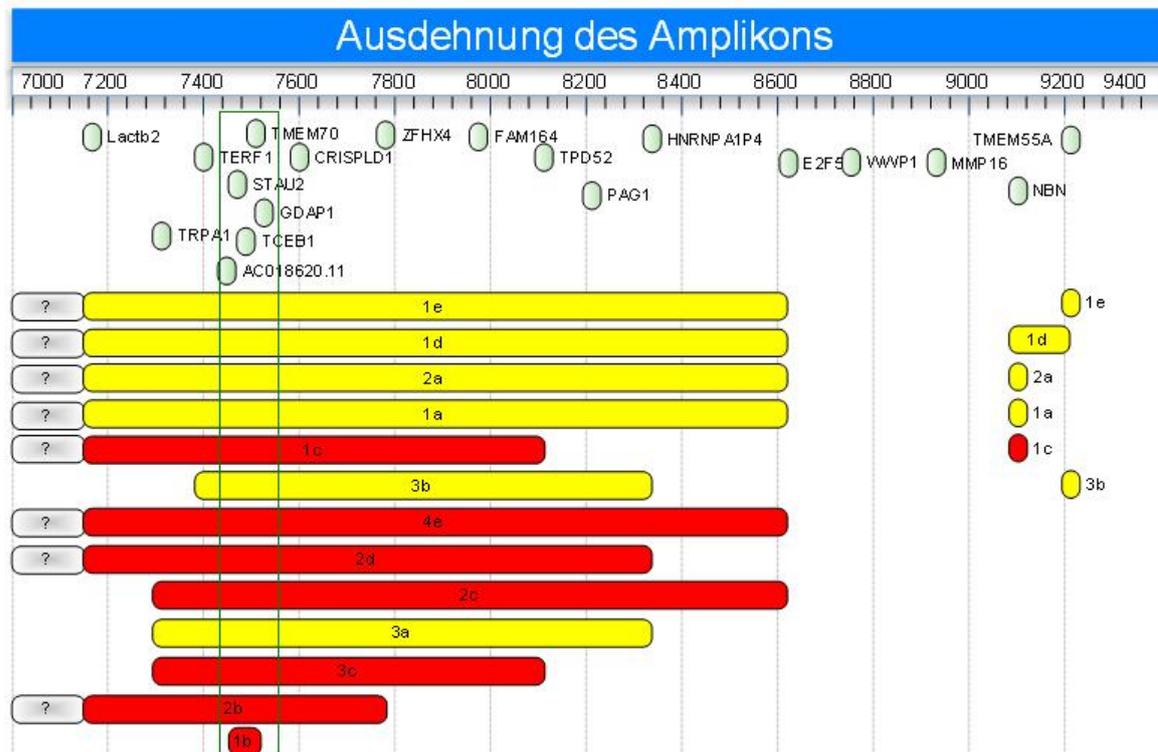
## 3.2 Kartierung des 8q21.3 Amplikons (Mapping-Array)

### 3.2.1 Ausdehnung des Amplikons

In diesem Teil der Arbeit wurde der aus 13 TMEM70 amplifizierten Brusttumoren bestehende Mapping-Array analysiert. Dafür wurden alle 19 ausgewählten Gensonden für die Gene LACTB2, TRPA1, TERF1, AC018620.11, STAU2, TCEB1, TMEM70, GDAP1, CRISPLD1, ZFHX4, FAM164A, TPD52, PAG1, HNRNPA1P4, E2F5, WWP1, MMP16, NBN und TMEM55A auf dem Array hybridisiert.

Die Hybridisierung wurde für einige Sonden mehrmals wiederholt, bis für alle 19 Gensonden bei allen 13 Tumoren ein Ergebnis erzielt werden konnte.

Die Gesamtlänge des untersuchten Chromosombereichs beträgt 20,58 Mb. In der Mehrzahl der Fälle (12 von 13) wurden die meisten der 19 Gene co-amplifiziert. Nur ein einziger Fall zeigte eine Amplifikation in einem kleineren Bereich von 0,64 Mb mit den Genen STAU2, TCEB1, TMEM70 und GDAP1. Die Gene WWP1 und MMP16 zeigten sich in keiner Probe als amplifiziert. Die Ausdehnung des Amplikons in den 13 Tumoren ist in Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 15 Ausdehnung des 8q 21 Amplikons:** Alle Tumoren die Cluster zeigten, sind rot markiert und alle die extrachromosomal amplifiziert waren, sind gelb markiert. Ein Balken steht für eine untersuchte Tumorprobe und deren amplifizierten Bereich. In grün ist der kleinste überlappende Bereich eingerahmt. Die mit ? markierten Kästchen liegen zentromer vom untersuchten Bereich und zeigen die fragliche weitere Ausdehnung in diese Richtung an.

### 3.2.2 Abhängigkeit der Amplikon-Architektur vom Amplifikationstyp

Diese Analyse sollte zeigen, ob es Unterschiede in der Amplikongröße gibt, je nachdem ob die Amplifikation dem intrachromosomalen HSR-Typus (homogeneously staining region) oder dem extrachromosomalen DM-Typus (double minute) entspricht.

7 von 13 Proben (53,85 %) können hierbei dem HSR-Typus, welcher sich als Cluster unter dem Mikroskop zeigt, zugeordnet werden. Die übrigen 6 (46,15 %) dem DM-Typus, dieser erscheint bei der Auswertung als extrachromosomale Amplifikation.

Es zeigte sich, dass bei Tumoren des HSR-Typus die Größe des Amplikons im Durchschnitt 8,94 Mb betrug. Die größte Probe ist die Nr. 4e mit 14,68 Mb, sie umspannt den Bereich der Gene LACTB2 bis E2F5. Das kleinste Amplikon ist dabei mit 0,64 Mb die Probe 1b. Diese ist in Abb. 15 mit grün markiert und enthält die Gene STAU2, TCEB1, TMEM70 sowie GDAP1. Diese 4 Gene sind bei der Analyse der Tumoren vom HSR-Typus am häufigsten, nämlich in allen 7 Proben (100 %), amplifiziert. Links und rechts dieses Kernbereichs findet man je Gen weniger Tumoren mit HSR Amplifikation. Erweitert man den kleinsten überlappenden Amplifikationsbereich, so reicht dieser vom Gen TRPA1 bis ZFHX4, welcher in 6 Tumorproben coamplifiziert war (Abb. 16).

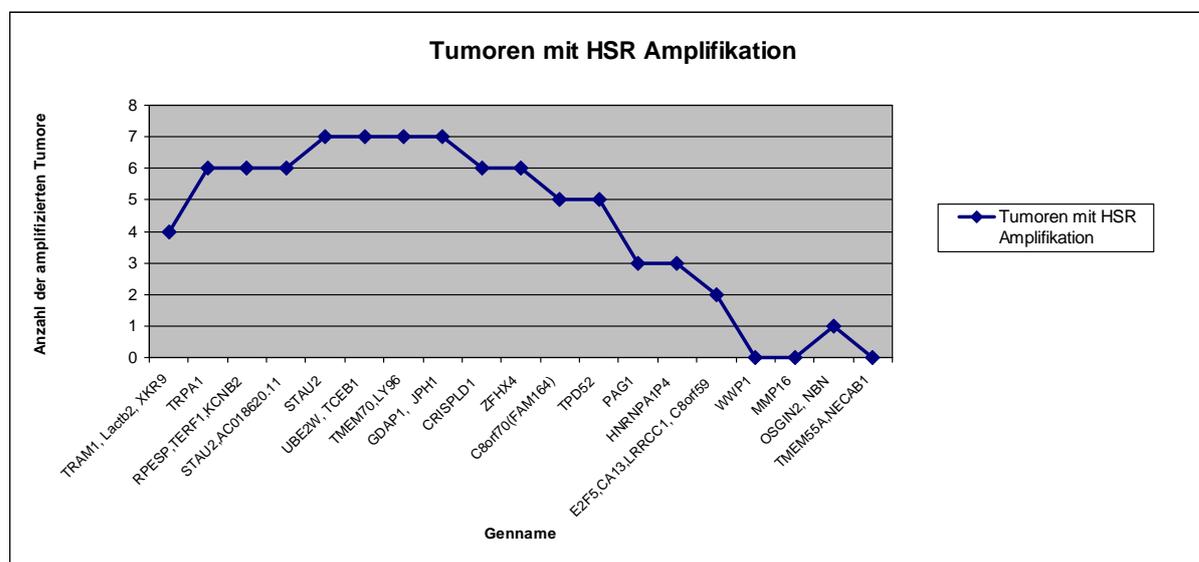
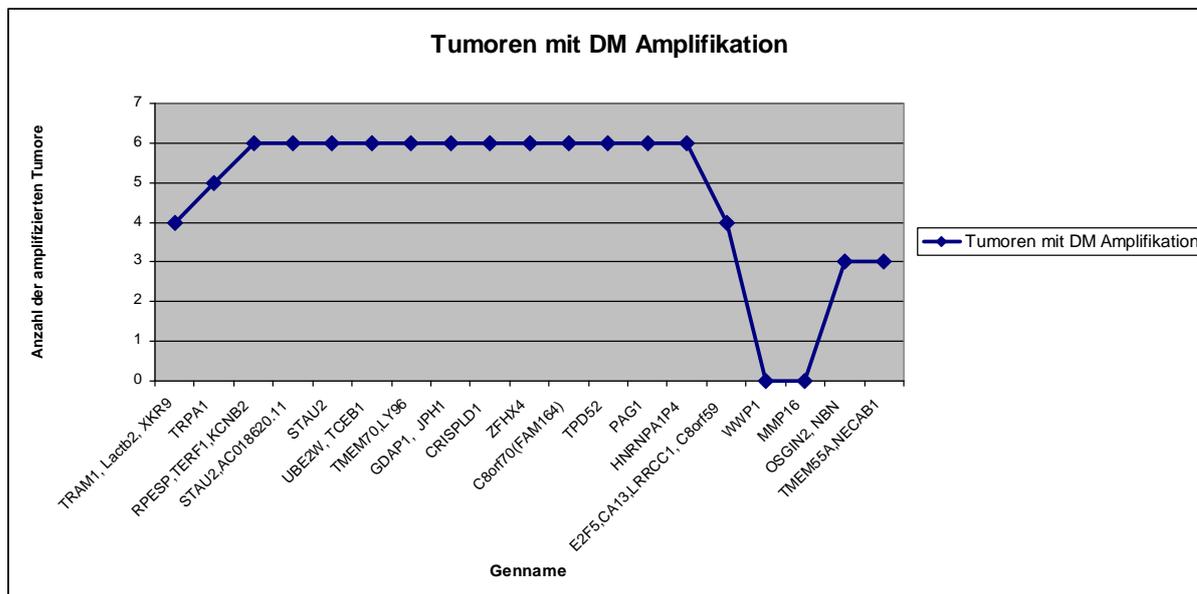


Abb. 16 Anzahl der clusteramplifizierten Tumoren pro untersuchtem Gen

Bei den Tumoren vom DM-Typus betrug die durchschnittliche Länge des Amplikons 13,11 Mb und war damit um 4,17 Mb größer als der HSR-Typus. In der Mehrzahl der Fälle (4 von 6 = 66,67 %) nahm die Amplifikation den gesamten Bereich von 8q13.3 - 8q21.2, also den Genen LACTB2 bis E2F5, ein. Nur zwei Proben waren mit einer Länge

von 10,4 Mb und 9,52 Mb jeweils etwas kürzer. Somit bildet beim DM-Typus die Probe 3b (9,52 Mb) den kleinsten überlappenden Bereich, dieser erstreckt sich vom Gen TERF1 bis HNRNPA1P4. Dieser Abschnitt ist wesentlich länger als der kleinste überlappende Bereich der HSR-Typus-Tumoren, beinhaltet diesen jedoch von den Genen STAU2 bis GDAP1 in allen Proben vollständig (Abb. 17).



**Abb. 17 Anzahl der extrachromosomal amplifizierten Tumoren pro untersuchtem Gen**

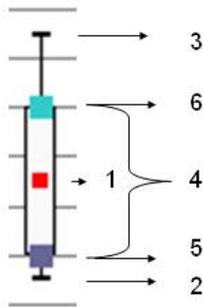
Besonders auffällig ist, dass beide Amplifikationstypen an derselben distalen Stelle abbrechen. Sowohl beim HSR- als auch beim DM-Typus sind die Gene WWP1 und MMP16 kein einziges Mal amplifiziert (Abb. 16, Abb. 17). Die danach folgenden Gene NBN und TMEM55a sind beim HSR-Typus in nur einem Tumor amplifiziert gefunden worden, beim DM-Typus in drei Proben.

Zentromerwärts ist das letzte untersuchte Gen LACTB2. Es ist bei beiden Amplifikationstypen in vier Proben amplifiziert vorgefunden worden, damit scheint proximal das Amplikonende noch nicht miterfasst.

### **3.2.3 Unterschiede im Amplifikationsniveau einzelner Gene**

Neben der bloßen Anzahl von Amplifikationen pro Gen interessierte bei der Auswertung ebenso, welche Unterschiede man zwischen den einzelnen Genen bezüglich ihrer Ratio (Gensignal/Zentromersignal) und der Kopiezahl feststellen konnte. Diesbezüglich wurden für die zwei unterschiedlichen Gruppen getrennte Analysen durchgeführt.

Zur Illustrierung der erhaltenen Werte wurden sogenannte Box-Plots erstellt. Diese erfassen neben dem tatsächlichen Ergebnis auch dessen Streuung und sind deshalb zur objektiven Anschauung sehr geeignet. In diesen findet man:



**Abb. 18 Schematische Darstellung eines Boxplots**

1. Median: derjenige Wert (Merkmalsausprägung), der in der Mitte steht, wenn alle Beobachtungswerte  $x_i$  der Größe nach geordnet sind.
2. Minimum: Kleinster Datenwert des Datensatzes = entferntester Ausreißer nach unten
3. Maximum: Größter Datenwert des Datensatzes = entferntester Ausreißer nach oben
4. Quartilabstand: Wertebereich, in dem sich die mittleren 50 % der Daten befinden = Ausdehnung der Box
5. Unteres Quartil: 25 % der Datenwerte sind kleiner oder gleich diesem Kennwert = Beginn der Box (lila Markierung)
6. Oberes Quartil: 75 % der Datenwerte sind größer oder gleich diesem Kennwert = Ende der Box (türkise Markierung)

Im Gegensatz zur vorhergegangenen Untersuchung, welche nur das bloße Vorhanden sein einer Amplifikation betrachtete, soll diese Auswertung bewerten, ob bestimmte Gene besonders hoch amplifiziert sind. Dafür wurde in einer ersten Analyse die Ratio zwischen den gezählten Gensignalen und der Zentromer 8 Sonde untersucht. Es zeigte sich, dass, wenn man beide Amplifikationstypen (HSR und DM-Typus) zusammen analysiert, keine deutlichen Unterschiede im Amplifikationsniveau für die einzelnen Gene hervorstechen (Abb. 19). Man sieht lediglich, dass das Gen mit der kleinsten Ratio WWP1 ist. Mit einer Ratio von 1 gilt es in der gesamten Untersuchung als nicht amplifiziert. Die übrigen Gene (alle vor WWP1) halten sich in dieser Betrachtung auf einem ähnlichen Niveau. Um eine genauere Aussage über die einzelnen Gene treffen zu können, ist es deshalb nötig, den HSR-Typus und den DM-Typus zu unterscheiden.

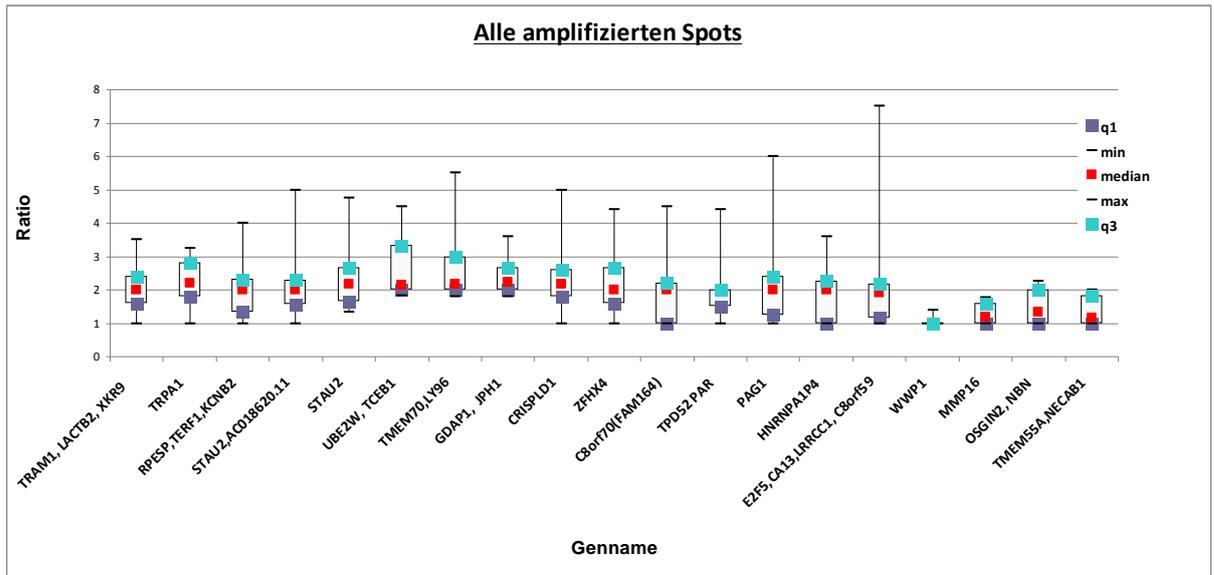


Abb. 19 Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene aller untersuchten Tumoren des 8q21 Amplikons

Es zeigte sich, dass die Tumoren, die dem HSR-Typus folgen, einen bogenförmigen Verlauf des Medians der Ratio haben. Bis zu den Genen TCEB1 und TMEM70 nimmt die Ratio stetig zu, danach nimmt sie wieder ab. Der Mittelwert der Ratio für TCEB1 beträgt 3,16 und für TMEM70 3,26. Zentromerwärts liegt er beim Gen LACTB2 bei 2,00 und distal ab WWP1 bei 1,1. Somit lässt sich festhalten, dass bei den Amplifikationen nach dem HSR-Typus, die Region der kleinsten Amplifikation (siehe Abb. 15), auch die mit der höchsten Ratio ist (Abb. 20).

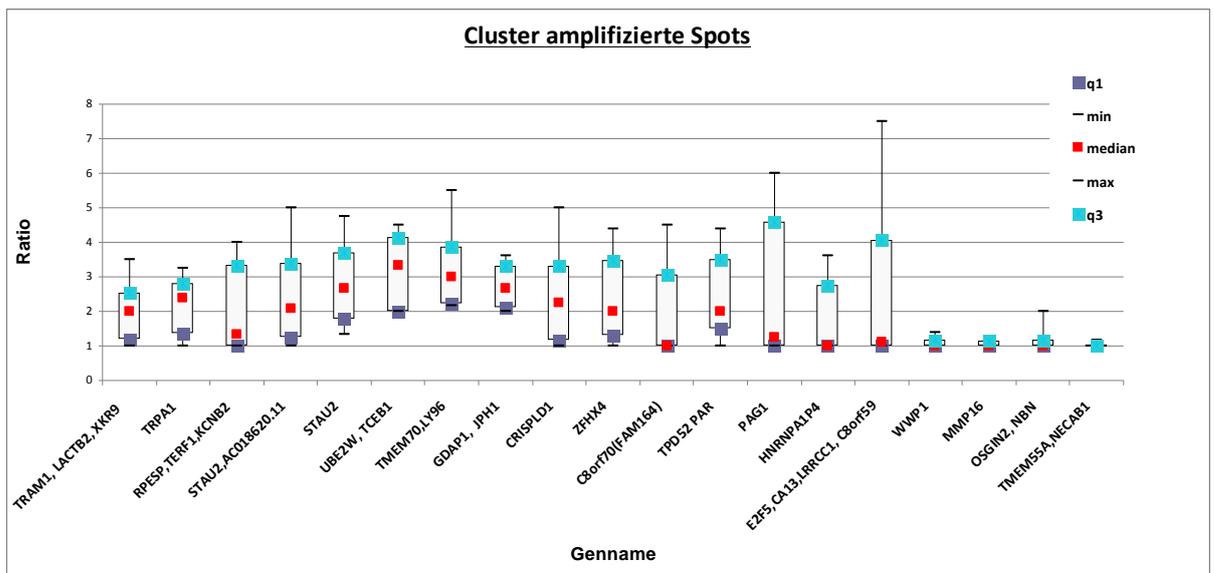
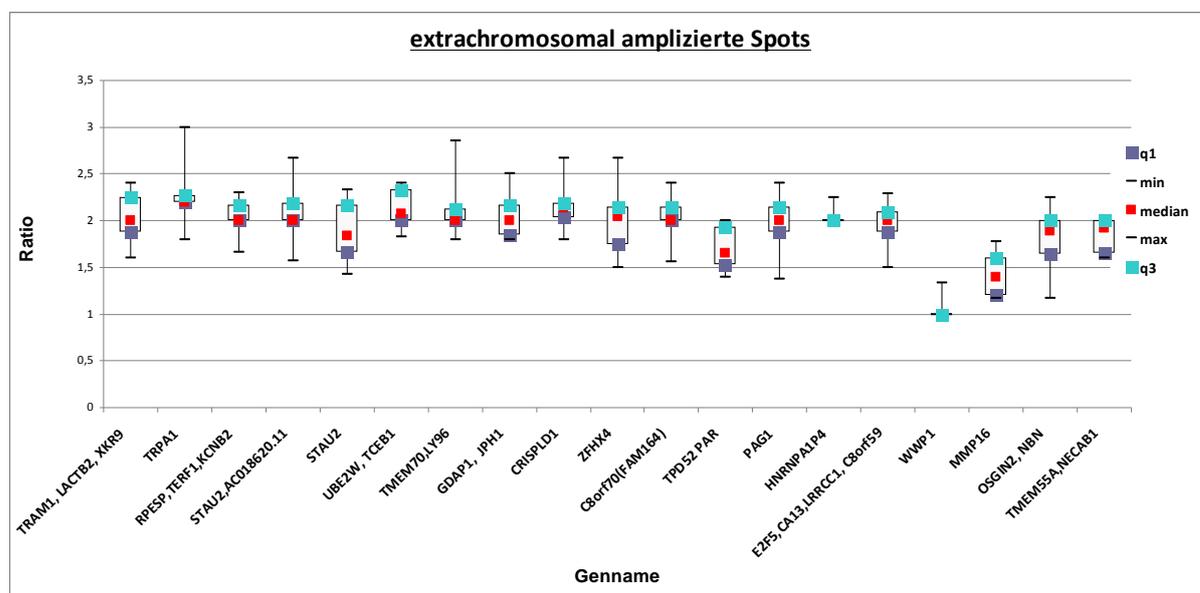


Abb. 20 Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene des HSR-Typus vom 8q21 Amplikons

Betrachtet man im weiteren Verlauf der Analyse die Tumoren des DM-Typus, kann man im Unterschied zu denen des HSR-Typus erkennen, dass deren Niveau über den gesamten Bereich der Gene LACTB2 bis E2F5 nahezu konstant bleibt. Die meisten Gene befinden sich um eine Ratio der Marke 2. Dies ist ein großer Unterschied zu den Tumoren mit Clustern. Deren Ratio war mit einem Wert von circa 3 deutlich höher. Die Amplifikationskriterien (s. 2.2.5) waren somit bei den Tumoren des HSR-Typus stärker erfüllt als bei jenen vom DM-Typus. Die Ratio des ersten untersuchten Gens LACTB2 hat einen Mittelwert von 2,03 und entspricht damit zwar gerade noch den Amplifikationskriterien, ist aber wie die restlichen Gene bei den Tumoren mit extrachromosomalen Amplifikationen knapp an der Grenze zum Gain. Auffällig ist außerdem auch hier, dass das Gen WWP1 mit der Ratio 1 nicht amplifiziert war und sich somit an dieser Stelle ein Einschnitt im Amplikon befindet.

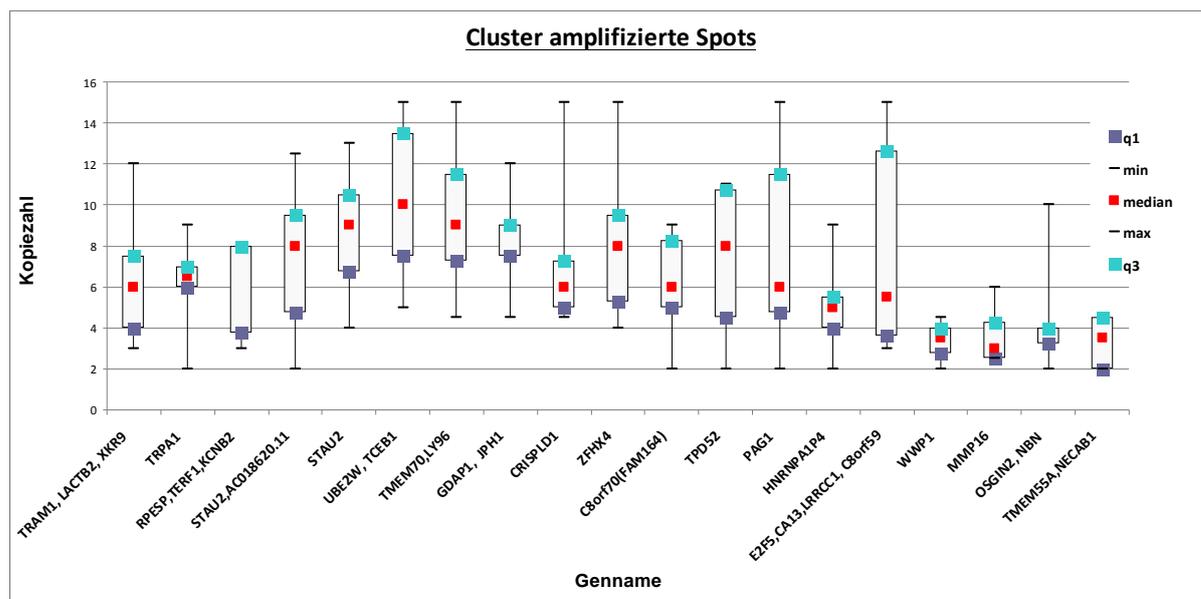


**Abb. 21** Darstellung der Verteilung der Ratio für die einzelnen Gene des DM-Typus vom 8q21 Amplikons

Nach der Analyse der Ratio wurde in einer zweiten Analyse nur die Genkopiezahl (ohne Zentromer) untersucht. In dieser Auswertung sind auch solche Fälle berücksichtigt, die aufgrund einer Aneusomie eine erhöhte Genkopiezahl besitzen, obwohl sie keine Amplifikation entsprechend der definierten Kriterien (s. 2.2.5) aufwiesen. Die Untersuchung soll zeigen, ob es Unterschiede bei der reinen Kopiezahlstärke zwischen clusteramplifizierten und extrachromosomal amplifizierten Spots gibt.

Betrachtet man wieder zunächst einmal die Tumoren des HSR-Typus, ist ähnlich wie bei der Analyse der Ratio, ein bogenförmiger Verlauf zu sehen. Dabei hat TCEB1 mit einem

Mittelwert von 10,28 Gensignalen einen deutlichen Vorsprung vor den anderen Genen. Danach folgt TMEM70 mit 9,43 Gensignalen. Im distalen Ende des untersuchten Bereiches nähern sich die Werte der Marke 2, was einem nicht amplifiziertem Gewebe entspricht. Proximal wurden beim Gen LACTB2 im Durchschnitt 6,28 Gensignale gezählt. Übereinstimmend mit den vorherigen Untersuchungen lässt sich hier zeigen, dass der kleinste überlappende Amplifikationsbereich (Abb. 15), neben der höchsten Ratio (Abb. 20), auch die höchste Kopiezahl besitzt (Abb. 22).



**Abb. 22 Darstellung der Verteilung der Kopiezahlstärke für die einzelnen Gene des HSR-Typus vom 8q21 Amplikons**

Führt man mit der Analyse der Kopiezahl der Tumoren vom DM-Typus fort, so lässt diese auf den ersten Blick keine Aussage über das Gen mit der höchsten Kopiezahl zu. Beim Gen TCEB1 ist ein kleiner Peak mit 7,83 Gensignalen zu erkennen, in der Summe bewegen sich die Werte aber in einem relativ einheitlichen Niveau. Lediglich WWP1 zeigt eine deutliche Senke und erreicht nur einen Wert von 3,08 Gensignalen. Dies ist noch kein Normwert für die Gensignale. Zusätzlich ist aus der Analyse der Ratio für das Gen WWP1 bekannt, dass es nicht amplifiziert war (Abb. 20). Das Ergebnis einer erhöhten Kopiezahl bei normwertiger Ratio, kann bei den untersuchten Tumoren nur durch eine Polysomie erklärt werden. Das am weitesten zentromerwärts gelegene Gen LACTB2 ist mit 6,08 Gensignalen noch deutlich häufiger als ein normales Gen zu zählen, da aber keine Sonde weiter proximal verwendet wurde, kann keine Aussage getroffen werden, wann die Kopiezahl auf dieser Seite zur Norm abfällt (Abb. 23).

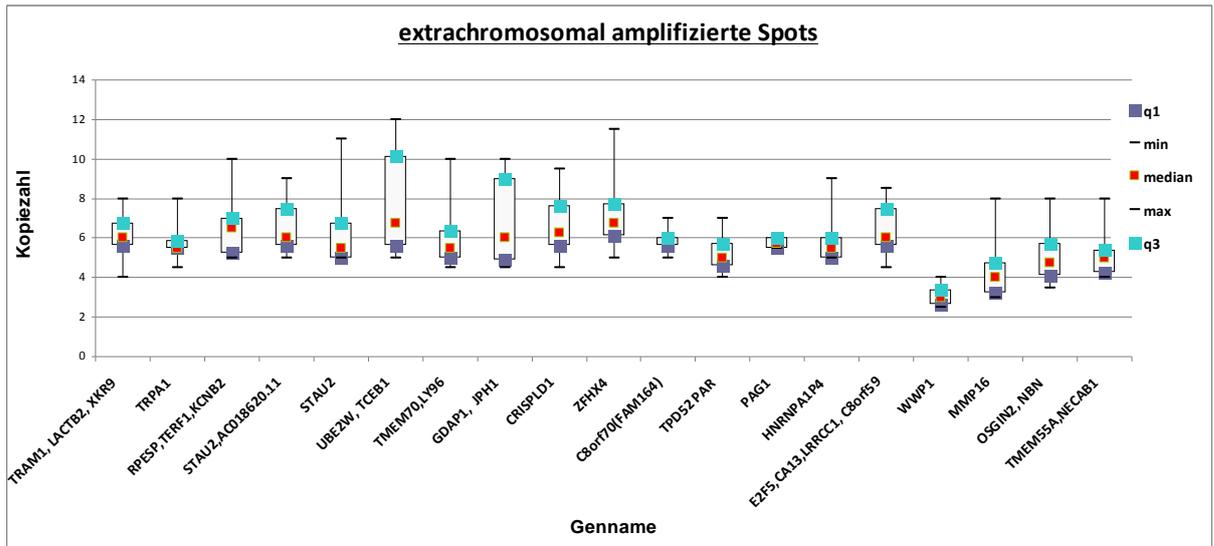


Abb. 23 Darstellung der Verteilung der Kopiezahlstärke für die einzelnen Gene des DM-Typus vom 8q21 Amplikons

### 3.2.4 Bilder des Spots 4e

Beispielhaft ist nachfolgend die Auswertung des Spots 4e dargestellt. Die Gene sind nach ihrer Lokalisation auf dem Chromosom 8q21 aufgelistet. Vom Gen LACTB2 bis E2F5 kann man deutliche Cluster erkennen. Ab WWP1 bis TMEM55a findet man nur noch Polysomien.

			Ratio	Kopiezahl
TRAM1, LACTB2, XKR9			2,7	8
TRPA1			2,8	7
RPESP, TERF1, KCNB2			2,7	8
ACO18620.11, STAU2			2,3	8
STAU2			2,7	8
UBE2W, TCEB1			4,3	15
TMEM70			3,0	9
GDAP1			3,0	9
CRISPLD1			5,0	15
ZFH4			4,3	15
C8orf70 (FAM164A)			2,1	8
TPD52			3,0	10
PAG1			4,7	14
HNRNPA1P4			3,6	9
E2F5, CA13, LRRCC1, C8orf59			5,0	15
WWP1			1,0	3
NBN, OSGIN2			1,0	4
TMEM55a, NECAB1			1,0	4

Abb. 24 Photos des Spots 4e

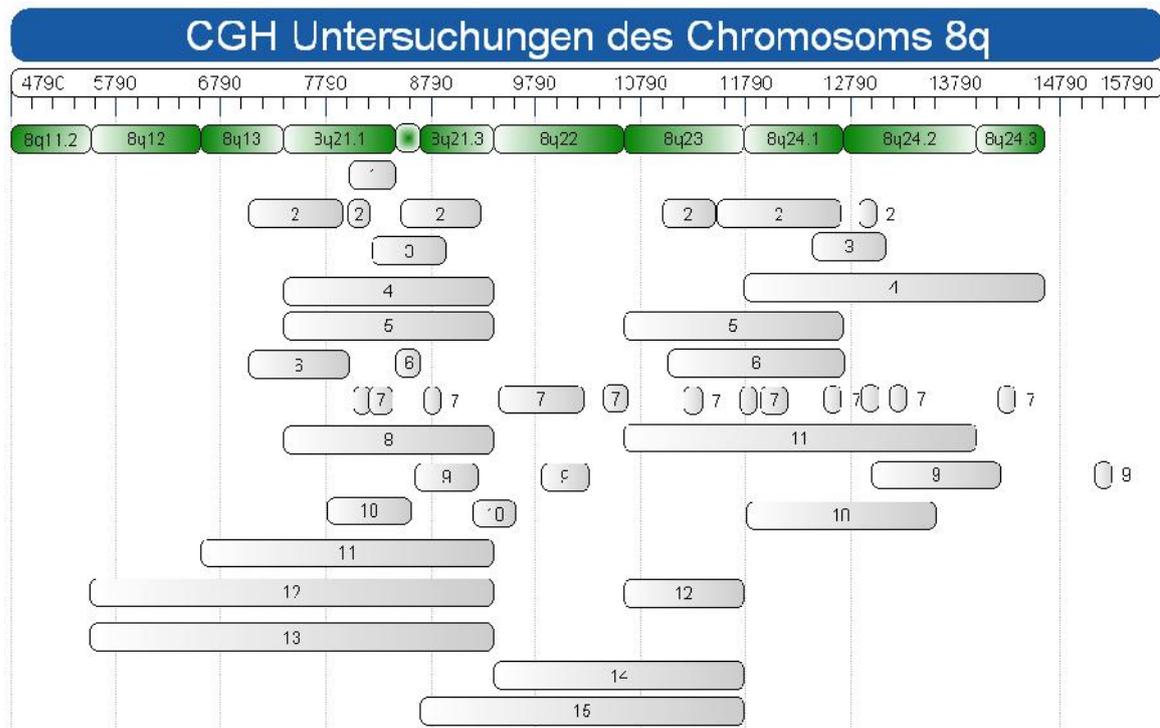
## 4 Diskussion

Das primäre Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Architektur des 8q21-Amplikons beim Mammakarzinom. Dazu wurden in einem ersten Schritt über 800 Mammakarzinome untersucht, um Tumoren mit einer 8q21-Amplifikation zu identifizieren. In der zweiten Phase der Arbeit wurden die ermittelten 8q21-amplifizierten Tumoren zu einem neuen TMA zusammengestellt und mit 19 verschiedenen FISH-Sonden, die einen Bereich von 20,58 Mb abdeckten, untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Amplikon in der Mehrzahl der Fälle den größten Teil des untersuchten Bereichs einnahm. Dennoch konnten Unterschiede für die einzelnen Gene herausgearbeitet werden, so dass man sie bezüglich Amplifikationshäufigkeit und –stärke differenzieren kann. Die Gene STAU2, TCEB1, TMEM70 und GDAP1 bilden hierbei den Kernbereich des 8q21 Amplikons. Sie wurden am häufigsten in allen Tumoren amplifiziert vorgefunden und zeigten die höchste Ratio (Gensignal/Zentromersignal). Das nur ca. 12 Mb vom Kernamplikon entfernte Gen WWP1 konnte dagegen in keiner einzigen Tumorprobe als amplifiziert aufgezeigt werden, obwohl es in der Literatur bereits als amplifiziert beschrieben wurde (vgl. Tab. 3). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Tumoren mit einer Amplifikation im Bereich TMEM70 und im Bereich WWP1 jeweils eine unterschiedliche Subgruppe darstellen. Das Fehlen von Tumoren mit TMEM70/WWP1 Coamplifikation könnte bedeuten, dass eine Überexpression beider Gene keinen Selektionsvorteil für den Tumor bringt.

Die Grenzen des Amplikons konnten zu beiden Seiten hin durch diese Arbeit präzisiert werden. Auf der telomerischen Seite kommt es nach dem Gen E2F5 zu einem signifikanten Abfall der Amplifikationshäufigkeit, was einen Rückschluss auf das mögliche Amplikonende in dem Bereich um 87 Mb zulässt. Dies lässt sich mit Hilfe der Abb. 19 nachvollziehen, wo man den Abfall der Ratio auf der telomerwärts gelegenen Seite hinter der Sonde E2F5 deutlich sieht. Die nachfolgende Sonde WWP1 erreicht nur noch eine Ratio von 1,10, so dass man annehmen kann, hier am Ende des Amplikons zu sein. Die in 1.4 beschriebenen Studien von Marchio und Rodriguez kamen jeweils zu einem Bruchpunkt an ähnlicher Stelle im 8q21 Amplikon. Bei Marchio begann ein neues Amplikon bei 87,26 Mb, bei Rodriguez bei 86,86 Mb.

Betrachtet man erneut die Abb. 19, so lässt sich über das zentromer gelegende Ende des Amplikons keine exakte Aussage treffen, da die Ratio des am weitesten zentromerwärts

gelegenen Gens der Untersuchung LACTB2 nicht unter die Amplifikationsgrenze sinkt. Es wird jedoch aus Abb. 20 klar, dass die Ratio zum Gen LACTB2 hin deutlich absinkt und folglich kann davon ausgegangen werden, dass der relevante Bereich erfasst wurde. Da kein zentromergelegenes Ende erfasst werden konnte, folgt daraus, dass das Amplikon vermutlich größer als bisher angenommen ist. Genauere Ausmaße müssten durch weitere Sonden geklärt werden.



**Abb. 25 Übersicht über eine Reihe von CGH Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen am Chromosom 8q an Brustkrebszellen.** **1:** Shehata M., et al., (2008). *Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52.* Clin Cancer Res. 15; 14(16):5050-60.; **2:** Rodriguez V., et al., (2007). *Chromosome 8 BAC array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer.* Genes Chromosomes Cancer, 46(7): 694-707.; **3:** Yao J., et al., (2006). *Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression.* Cancer Res.; 66(8): 4065-78.; **4:** Melchor L., et al., (2005). *The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors.* Clin Cancer Res.; 11(24 Pt 1): 8577-84.; **5:** Kallioniemi A., et al., (1994). *Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization.* Proc Natl Acad Sci U S A.; 91(6): 2156-60.; **6:** Shaadeo A., et al., (2006). *Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes.* Breast Cancer Res.; 8(1): R9.; **7:** Marchiò C., et al., (2008). *Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast.* J Pathol.; 215 (4): 398-410.; **8:** Polanowska J., et al., (2000). *Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors.* Genes Chromosomes Cancer; 28(1): 126-30.; **9:** Hyman E., et al., (2002). *Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer.* Cancer Res.; 62(21): 6240-5.; **10:** Pollack JR., et al., (2002). *Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A.; 99(20):12963-8.; **11:** Fejzo MS., et al., (1998). *Molecular cytogenetic analysis of consistent abnormalities at 8q12-q22 in breast cancer.* Genes Chromosomes Cancer; 22(2): 105-13.; **12:** Rummukainen J., et al., (2001). *Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping.* Cancer Genet Cytogenet.; 126(1): 1-7.; **13:** Balleine RL., et al., (2000). *The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma.* Genes Chromosomes Cancer; 29(1): 48-57.; **14:** Trikkonen M., et al., (1998). *Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH.* Genes Chromosomes Cancer; 21(3): 177-84.; **15:** Isola JJ., et al., (1995). *Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer.* Am J Pathol.; 147(4): 905-11.

Ein Vergleich mit der Literatur zeigte, dass der untersuchte Bereich von 71,49 Mb – 92,07 Mb, jedoch nur ein Subamplikon in 8q darstellt. Wie die Abb. 25 zeigt, können auf dem langen Arm des Chromosoms 8 primär zwei unterschiedliche Amplikonregionen gefunden werden: Einer bei 8q21 und einer bei 8q24. Zu demselben Ergebnis kam auch die Studie von Rodriguez et al. (2007). Die Arbeitsgruppe konnte distal dem Bereich 8q24 erneut das gut untersuchte Gen MYC<sup>57</sup> als Promoter zuordnen. Das proximale Amplikon von 8q21 wurde durch die Gruppe genauer spezifiziert. Sie fanden 3 getrennte Amplikons in diesem Bereich: **#1** mit den Genen LACTB2, TCEB1 und ZFH4 (70,5-79,5 Mb, Länge von 9 Mb), **#2** mit dem Gen TPD52 (~ 80,5-82,9 Mb, Länge von 2,4 Mb) und **#3** mit REXO1L1, MMP16, DECR1 (85.1-92.6 Mb, Länge von 7,5 Mb).<sup>58</sup> Das Gen TMEM70/TCEB1 befindet sich laut dieser Studie also in einem 1. Amplikon getrennt vom Gen TPD52 (2. Amplikon) und ebenso unabhängig vom Gen WWP1, welches im 3. Amplikon liegt. Dieser Zustand ist besonders interessant, weil wie oben erwähnt bei der Auswertung des Mapping-Arrays keine einzige Coamplifikation von TMEM70/TCEB1 und WWP1 gefunden wurde. Dies legt den Gedanken nahe, dass verschiedene unabhängige Zielgene für „das“ 8q21 Amplikon in Frage kommen.

Die wichtigsten Kandidaten werden im Folgenden beleuchtet, zunächst die beiden Gene TMEM70 und TCEB1. Sie stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Beide Gene waren in der Untersuchung am häufigsten amplifiziert und besitzen eine für die Tumorentstehung interessante Funktion.

**TMEM70** (transmembrane protein 70) wurde anhand der Gensonde RP11-6I2 untersucht. Diese kodiert die Gene LY96 (lymphocyte antigen 96) und TMEM70. LY96 interagiert mit den so genannten TLR4 und TLR2 Rezeptoren, die für die Immunantwort auf Bakterien eine Rolle spielen.<sup>59</sup> Ein Zusammenhang mit Brustkrebs ist aufgrund dieses Genes bisher nicht bekannt. Wie in Choschick M. et al. (2010) erklärt, kodiert das Gen TMEM70 für ein kleines 30 kD großes Protein der inneren Mitochondrienmembran. Der Wild-Typ dieses Proteins ist für die ordnungsgemäße Biogenese von ATP nötig. Dies wurde bei einigen mitochondrialen Erkrankungen mit reduzierter Proteinaktivität gezeigt.<sup>60, 61</sup> Aus einer gesteigerten Aktivität der ATP Synthese resultiert ein erhöhtes Niveau von reaktiven Sauerstoffmolekülen (sog. ROS) in den Zellen. Erhöhtes intrazellulär vorkommendes ROS wurde in vielen verschiedenen Krebsarten, inklusive dem Brustkrebs, bereits beschrieben.<sup>62, 63, 64</sup> Darüber hinaus wurde veröffentlicht, dass ein hoher ROS Level eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 verursacht,<sup>65, 66</sup> welcher ebenfalls in Zusammenhang mit der Krebsentwicklung gebracht wird. Denn

die Stabilisation von HIF-1, durch gesteigerte aerobe Glykolyse (Warburg Effekt), spielt eine zentrale Rolle bei vielen humanen Tumorarten.<sup>67</sup> Deshalb könnte es sein, dass die TMEM70 Amplifikation mit einer Erhöhung von ROS zu einem Wachstumsvorteil für Brustkrebszellen führt. Neben dieser auffälligen Funktion des Gens TMEM70 ist auch seine signifikante Prognoserelevanz schon an einem großen Mammakarzinom-Array in einer Voruntersuchung gezeigt worden. Dies macht das Gen zu einem potentiellen Zielgen.<sup>68</sup>

Dicht neben TMEM70 liegt **TCEB1** (Transcription elongation factor B, polypeptide1), welches mit einem sehr ähnlichen Amplifikationsniveau abschnitt. Sein Protein Elongin C dient als Cofaktor zur Aktivierung der Elongation bei der Transkription durch die RNA Polymerase II.<sup>69</sup> Durch Ausschaltung von TCEB1 in der Prostatazelllinie PC-3 wurde eine verminderte Tumorinvasion festgestellt, was auf eine onkogene Potenz des Gens bei Amplifikation zurückschließen lässt.<sup>70</sup> Im Zytoplasma ist das Protein von TCEB1 ein Teil des von Hippel-Lindau (VHL) Proteinkomplexes. Mutationen im VHL sind häufig und verursachen unter anderem Nierentumore.<sup>71</sup> Eine Studie wies eine TCEB1 Überexpression mittels quantitativer RT-PCR in TCEB1 amplifizierten SK-BR-3 Brustkrebszelllinien nach.<sup>72</sup> Noch ist die gesamte Wirkung des Gens TCEB1 auf die Zelle durch seine komplexen Interaktionen nicht vollständig aufgeklärt, doch bisher scheint ein onkogenes Potential mehr als denkbar. Um das Gen TCEB1 zu detektieren, wurde die Gensonde RP11-559C13 benutzt, in dieser ist auch das Gen UBE2W enthalten. Das ubiquitin-conjugating-enzyme E2W katalysiert die kovalente Bindung von Ubiquitin zu anderen Proteinen.<sup>73</sup> Eine Verbindung zur Entwicklung von Brustkrebs konnte für dieses Gen bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Dem 2. Amplikon wurde **TPD52** als potenzielles Zielgen zugeordnet. Ausgeschrieben steht diese Abkürzung für Tumor Protein D 52. Alle bisher vermuteten und identifizierten D52-ähnlichen Sequenzen besitzen so genannte coiled-coil Domänen, was den Schluss zulässt, dass ihre komplexen Funktionen in der Protein-Protein Interaktion liegen.<sup>74</sup> Besonders entscheidend dabei scheint, dass D 52 als positiver Regulator der Zellproliferation dient.<sup>75</sup> Bereits 1995 wurde eine Arbeitsgruppe bei der Analyse überexprimierter Gene in Tumoren auf TPD52 aufmerksam, als sie es mittels Northern Blot und anschließender In-situ-Hybridisierung in Brusttumoren überexprimiert vorfand.<sup>76</sup> Als tatsächlich amplifiziert wurde es schließlich in Prostatatumoren und Ovarialkrebs gefunden.<sup>77, 78</sup> Doch auch im Mammakarzinom konnte seine Amplifizierung

mehrfach nachgewiesen werden.<sup>79, 80</sup> Es ist vor allem in den aggressiven Grad 3 Tumoren zu finden und verursacht eine verringerte Überlebenszeit der Patientinnen.<sup>81</sup>

In der weiter oben erwähnten Array-CGH Studie von Rodriguez et al., die 8q21 in 3 getrennte Amplikons unterteilt, befindet sich TPD52 in dem zweiten nur 2,4 Mb großen Amplikon.<sup>82</sup> Damit ist es also getrennt von den anderen beiden möglichen Zielgenen TCEB1 und TMEM70. Betrachtet man die Abb. 15, so kann man jedoch erkennen, dass die beiden Gene und TPD52 in den meisten Fällen coamplifiziert sind, was die Existenz von zwei getrennten Amplikons nicht widerlegt, jedoch bei den untersuchten Tumoren unwahrscheinlich macht.

Im 3. Amplikon liegt Gen **WWP1** (WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1). Um es zu detektieren wurde die Gensonde RP11-459L5 verwendet, die kein anderes zusätzliches Gen enthält. WW-Domänenhaltige Proteine werden in allen Eukaryonten gefunden und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler Zellfunktionen, wie diversen Protein-Protein-Interaktionen, der Transkription und dem RNA Splicing. Diese Regulierung wird durch Transferierung von Ubiquitin direkt auf die Zielsubstrate erreicht.<sup>83, 84</sup> Im Zuge der häufigen Amplifikation von 8q21 wurde auch WWP1 als amplifiziert und zusätzlich überexprimiert in Brusttumoren vorgefunden.<sup>85</sup>

Ein „Grenzgen“ scheint das Gen **E2F5** zu sein. Es wurde mit der Gensonde RP11-219B4 untersucht. Sie enthält die Gene CA13, LRRCC1, C8orf59 und E2F5. Die drei erstgenannten Gene wurden bisher noch nicht mit der Krebsentwicklung assoziiert. Anders hingegen das Gen E2F5 selbst. Es gehört zur E2F Familie, die als Transkriptionsfaktor interagiert und eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und der Aktivität von Tumorsuppressorproteinen einnimmt. So interagiert das Protein von E2F5 z.B. mit dem Tumorsuppressor p130.<sup>86</sup> Die Amplifikation des Gens wird in der Literatur mit Werten zwischen 4,2 % und 8,8 % angegeben, außerdem ist neben seiner Überexpression auch ein negativer Einfluss auf das Überleben der Patientinnen bekannt.<sup>87, 88</sup> Obwohl E2F5 nur eine Mb von WWP1 entfernt liegt, ist es deutlich häufiger amplifiziert gefunden worden. Dies spricht für die Existenz getrennter Amplikons in 8q21.

Interessanterweise waren WWP1 und TMEM70 in nicht einer einzigen Tumorprobe koamplifiziert. Dies legt nahe, dass es in der Nähe von WWP1 einen anderen Bruchpunkt bei der Amplikontstehung gibt. Ein auffälliges Gen, welches sich 3,4 Mb distal von WWP1 befindet, ist das sogenannte **NBN** (Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)) Gen. Dieses könnte die Ursache für einen solchen Bruchpunkt sein und bestärkt die Vermutung auf ein distal von TMEM70 existierendes unabhängiges zweites Amplikon. Nibrin ist

bekannt durch das Nijmegen-Breakage-Syndrom, eine seltene angeborene Störung der DNA Reparaturmechanismen und verstärkter Chromosomenbrüchigkeit, die mit extrem frühem Auftreten von Tumoren einhergeht. Funktionell ist es ein Teil des MRE11/RAD50/NBN (MRN Komplex), der eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA Schäden und dem Instandhalten chromosomaler Vollständigkeit spielt. Der Komplex ist bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, der DNA Rekombination, dem Aufrechterhalten intakter Telomere, bei der Zellzykluskontrolle und der Meiose beteiligt.<sup>89</sup> Bisher gibt es kein Paper, das sich gezielt mit der Amplifikation von NBN beschäftigt, jedoch wurde es mehrfach bei größeren Untersuchungen als amplifiziert erwähnt.<sup>90, 91</sup> In der hier durchgeführten Studie wurde kein auffälliges Amplifikationspotential für NBN nachgewiesen, was an seiner distalen Lage im Untersuchungsbereich liegt und gut mit einer Position in einem getrennten Amplikon vereinbar ist.

Unter den mehr als 80 Genen des Chromosomenabschnittes 8q21 befinden sich neben den oben erläuterten Genen noch einige weitere, die in der Literatur bereits erwähnt wurden. Keines von ihnen wurde jedoch bisher als amplifiziert beim Mammakarzinom und gleichzeitig mit relevanter Funktion für die Brustkrebsentwicklung beschrieben, deshalb scheint ihre Stellung als Zielgen bisher unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Architektur von 8q21 von 2 verschiedenen Amplifikationsmechanismen abhängt: Zum einen vom HSR-Typus (Cluster) und zum anderen vom DM-Typus (Extrachromosomale Amplifikation).

Die Ergebnisse des Mapping-Array waren sehr davon abhängig, ob man die Spots mit Clustern oder mit extrachromosomaler Amplifikation betrachtete. So war bei der Auswertung der extrachromosomalen Tumorproben eine endgültige Aussage nur schwer zu treffen, denn hier bildeten sich zumeist lange Plateaus ohne ein hervorstechendes Maximum. Bei den Cluster Spots hingegen waren deutliche Peaks auszumachen.

Betrachtet man dafür zunächst einmal die Abb. 16 und Abb. 17 (Anzahl der amplifizierten Tumoren pro Gen), erkennt man, dass es unter den Tumoren vom HSR-Typus ein Maximum zwischen STAU2 (74,53 Mb) und GDAP1 (75,17 Mb) gibt, bei den extrachromosomal amplifizierten Spots aber ein Plateau von TERF1 (73,82 Mb) bis HNRNPA1P4 (83,34 Mb). Noch deutlicher wird dieser Zustand, wenn man die Abb. 20 und Abb. 21 miteinander vergleicht, welche die Ratio der Spots analysieren. So lässt sich unter den HSR-Tumoren ein Maximum bei der Gensonde von TCEB1 erkennen, unter den extrachromosomal amplifizierten Spots ist hingegen ein durchweg einheitliches

Ergebnis zu finden. Bei der Betrachtung der Genkopiezahl in Abb. 22 und Abb. 23 zeigt sich unter den Clustern ein Peak, dagegen unter den extrachromosomal amplifizierten Spots wieder nur ein relativ einheitliches Niveau. Die Erklärung dafür, dass bei der Amplifikation nach dem HSR-Typus ein Peak entsteht und nach dem DM-Typus ein Plateau, liegt möglicherweise in der Art der Entstehung der beiden Amplifikationstypen (vgl. 1.2).

Beim HSR-Typus kommt es an noch nicht definierten Stellen des Chromosoms zu Brüchen und anschließender Brückenbildungen zwischen den jeweiligen Schwesterchromatiden.<sup>92</sup> Beide Vorgänge sind, wie bisher angenommen werden muss, vom Zufall abhängig und deshalb resultieren daraus in jedem Replikationsdurchgang Amplikons verschiedener Größen. Denn je nachdem wo der Bruch stattfindet, und an welcher Stelle nach der Brückenbildung die erneute Trennung zwischen den Schwesterchromatiden geschieht, werden andere Gene coamplifiziert. Dabei entstand nach Auszählung der Amplifikationen der einzelnen Gene, wie in Abb. 16 zu erkennen, eine Art Treppmuster. In der Spitze der Treppe, dem kleinsten überlappenden Bereich aller Chromosomenbrüche, befindet sich vermutlich das Zielgen des Amplikons, welches der Zelle einen Wachstumsvorteil verschafft. Um unter den Genen im kleinsten überlappenden Bereich das wahre Zielgen zu ermitteln, ist es nötig funktionelle Analysen der exprimierten Gene im Amplifikationsbereich durchzuführen, z. B. die Gene künstlich in Tumorzellen zu überexprimieren. Eine durch die Überexpression verursachte gesteigerte Tumorentstehung gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass das entsprechende Gen eine tumorrelevante Rolle spielt.

Bei der Amplifikation vom DM-Typus entsteht extrachromosomal gelegenes Genmaterial, welches meist in Form von kleinen Ringen vorliegt.<sup>93</sup> Diese Strukturen sind nach ihrer Entstehung konstant in der Länge und ihrem enthaltenen Genmaterial. Bei einer anschließenden Zellteilung mit Replikation und Mitose entsteht eine identische Kopie dieses Ringes. Deshalb sieht man in der Auswertung ein Plateau, da immer nur dieselben Gene im extrachromosomalen Material enthalten sind.

Aus Sicht der Therapierelevanz ist eine Unterscheidung in HSR- und DM-Typus äußerst wichtig. So konnte bereits gezeigt werden, dass Tumoren des DM-Typus auf die Gabe von Hydroxyurea, ein DNA Replikationsinhibitor, mit einer Reduktion von DMs reagieren, wogegen HSR Tumoren nicht darauf ansprechen.<sup>94</sup>

Bei der Analyse der Literatur fiel auf, dass das am häufigsten benutzte Verfahren zur Untersuchung des 8q21 Amplikons die CGH war. Durch dieses Verfahren wurden Amplifikationsraten für den Bereich 8q21 von 4,2 %, <sup>95</sup> 26,25 % <sup>96</sup> und 58,3 % <sup>97</sup> gefunden. In dieser Arbeit wurde eine Amplifikationsrate von 2,75 % für das Gen TMEM70 bestimmt (vgl. 3.1.1). Damit liegt sie deutlich niedriger als die Werte der Literatur. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Zerklüftung des 8q21 Amplikon, denn während die CGH die Chromosomenveränderung eines ganzen Bereichs detektiert, können mit einem Mapping-Array und FISH Unterschiede für jedes einzelne Gen festgestellt werden. Besteht ein zu untersuchender Chromosomenabschnitt nun aus mehreren verschiedenen Amplikons, so werden diese bei einer Untersuchung per CGH alle gemeinsam betrachtet und eine höhere Amplifikationsrate entsteht. Bei der Detektion von Genveränderungen mit Hilfe eines Mapping-Arrays und FISH kann jedes Amplikon für sich betrachtet werden und somit resultiert eine niedrigere Amplifikationsrate.

Zu Beginn der Arbeit wurde ein Mammakarzinom-Array mit 814 Tumorproben analysiert. Dieser wurde mit der Gensonde TMEM70 per FISH gescannt und die Tumorproben mit Auffälligkeiten hinsichtlich dem histologischem Typ, dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus, der Tumorentdifferenzierung und dem Zusammenhang zu anderen Tumormarkern (Östrogenrezeptor, Her2) analysiert. Dabei konnte man eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer Amplifikation und einem hohen Tumorstadium als auch einer geringen Tumorentdifferenzierung feststellen (vgl. Tab. 7). Alle Tumorproben, die eine Amplifikation zeigten, wurden dem histologischen Typ „duktales Mammakarzinom“ zugeordnet. Ein Einfluss auf die Verschlechterung der Überlebensprognose konnte nicht aufgezeigt werden. Ein Grund hierfür ist der allgemein gute Krankheitsverlauf der untersuchten Patientinnen, denn nur weniger als 10 % der Patientinnen erlitten ein Rezidiv oder verstarben. Durch diese niedrige Eventrate ist eine statistische Auswertung zur Bestimmung der Prognoserelevanz nicht möglich gewesen. Wie die vorangegangene Arbeit von Paula Lassen zeigte, ist in einem größeren Subset jedoch sehr wohl eine Prognoserelevanz der 8q21 Amplifikation nachzuweisen.<sup>98</sup>

Die TMA-Strategie ist das Fundament dieser Arbeit. Mit ihrer Hilfe wurden über 800 Tumoren in kürzester Zeit analysiert, diese Große Anzahl ist nötig um Tumoren mit einer bestimmten Eigenschaft zu finden. Ohne TMA wäre die praktische Umsetzung einer solchen Untersuchung im Prinzip unmöglich, denn Amplifikationen sind so selten, dass

man erst bei Untersuchung einer sehr großen Tumoranzahl zu einem statistisch relevanten Ergebnis kommen kann. Dies wäre mit einem herkömmlichen Schnittverfahren nicht praktikabel, da ein solches Verfahren viel zu zeit- und kostenaufwändig ist. Außerdem ist man bei einem TMA nicht auf eine Methode beschränkt, sondern es können neben der hier durchgeführten FISH unter anderem auch immunhistochemische Untersuchungen genutzt werden. Unabhängig vom eingesetzten Verfahren kann man bei allen Proben mit sehr vergleichbaren Ergebnissen rechnen, da alle mit derselben Dosis Reagenzien, bei der gleichen Temperatur und identischer Zeit behandelt werden. Besonders bei selbsthergestellten FISH-Sonden ist dies wichtig, da ihre Qualität sehr schwanken kann. Zusätzlich erhält man mit dieser Technik durch die Möglichkeit vieler Untersuchungen an einem Tumor eine Vielzahl von Daten pro Tumorprobe. Auf diese kann man im Verlauf zurückgreifen und die gewonnenen Daten vergleichen und zusammenführen. Grund dafür ist, dass das Gewebe, wie in Abb. 5 erklärt, nicht nur für eine einmalige Untersuchung eingesetzt werden kann, sondern auch für Folgeuntersuchungen zur Verfügung steht, bis alle Paraffinblöcke aufgebraucht sind. Archiviert man den operativ entfernten Tumor, bietet die TMA-Technik außerdem, aufgrund ihrer besonderen Gewebesparsamkeit, auch die Möglichkeit vom selben Tumor eine neue Probe zu erhalten. Mit dieser Probe kann dann, wie im vorliegenden Fall, ein neuer Array gestanzt werden, um andere Fragestellungen zu klären. Auch jetzt nach Abschluss der Arbeit sind noch genügend Slides übrig, um zum Beispiel eine weiterführende immunhistochemische Untersuchung an den identifizierten Tumoren mit 8q21-Amplifikation durchzuführen.

Eine Stärke der Arbeit war, dass eine Untersuchungsmethode gewählt wurde, mit der man sehr strukturiert den Chromosomenabschnitt untersuchen konnte. Die Kombination der TMA- mit der FISH-Technik brachte Licht in die Amplikonstruktur. Denn mit ihr testete man nicht erneut die Amplifikationsrate eines willkürlich gewählten Gens, sondern konnte Vergleiche zwischen den einzelnen Genen anstellen. Deshalb verwendete man eine Vielzahl verschiedener Gensonden bei dieser Arbeit. Doch die Untersuchung wies eine bedeutende Schwäche auf: Sie war vorselektioniert. Um Kosten und Zeit zu sparen, inkubierte man die Gensonden nicht auf einem großen Mammakarzinom-Array, sondern auf einem neu konstruierten Mapping-Array, der nur diejenigen Tumorproben enthielt, die eine bereits bestätigte TMEM70 Amplifikation aufwiesen. So konnte zwar eine Aussage zu TMEM70 innerhalb „seines“ Amplikons gemacht werden, ein Vergleich zur Amplifikationsstärke von WWP1 war aber zum Beispiel nicht möglich, da sie in

getrennten Amplikons zu liegen scheinen. Die Erkenntnis dieser Tatsache war gleichzeitig eine Stärke der Arbeit, weil sie das Ende des einen und den Anfang des nächsten Amplikons bedeutet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass das proximale 8q21 Amplikon beim Mammakarzinom ca. 14,7 Mb und 58 Gene umfasst. Diese Mappingstudie bestimmte, dass das Gen TMEM70 zusammen mit dem Gen TCEB1 im Zentrum des Amplikons lokalisiert ist. Beide Gene sind gute Kandidaten für das tumorbiologisch relevante Zielgen des Amplikons.

## 5 Zusammenfassung

Amplifikationen auf Chromosom 8q21 wurden bei ca. 3-58,3 % der Mammakarzinome beschrieben. Studien, die diesen Bereich kartiert haben, deuten auf die Existenz von mindestens 3 unabhängigen Amplikons innerhalb von 8q21 hin. Eines dieser Amplikons ist um das Gen TMEM70 herum gelegen. Bisher ist allerdings nicht bekannt, wie groß dieses Amplikon ist und welche möglichen Kandidatengene es einschliesst. Ziel dieser Arbeit war es, die Architektur des 8q21-Amplikons um das Gen TMEM70 beim Mammakarzinom zu bestimmen.

Im ersten Teil der Studie wurde ein Gewebemikroarray mit 814 Mammakarzinomen mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Amplifikationen vom TMEM70 untersucht. 509 (62,53 %) Proben konnten erfolgreich analysiert werden, unter ihnen befanden sich 14 Tumoren (2,75 %) mit TMEM70 Amplifikation, alle 14 waren duktaler Genese.

Um die Ausdehnung des Amplikons zu bestimmen, wurde im zweiten Teil der Arbeit aus 13 dieser Tumoren ein neuer Gewebemikroarray (Mapping-Array) angefertigt. Ein Tumor musste von diesem Array ausgeschlossen werden, weil auf dem zugehörigen Gewebeblock nicht mehr ausreichend Tumormaterial für die TMA-Konstruktion vorhanden war. Dieser Mappingarray wurde mit 19 selbst hergestellten FISH Sonden analysiert, die den Bereich der Gene TRAM1-TMEM55A (Positionen 71,49-92,07 Mb, Grösse 20,58 Mb) im Abstand von ca. 1 Mb abdecken.

Es zeigte sich, dass das Amplikon zum 8q-Telomer hin bis zum E2F5 Gen (Position 86,17 Mb) reichte. Auf der centromerwärts gelegenen Seite konnte das Ende des Amplikons mit den vorselektierten 19 FISH-Sonden nicht bestimmt werden.

Die am häufigsten amplifizierte Gene waren TCEB1 (13/13) und TMEM70 (13/13). Diese Gene zeigten auch das höchste Amplifikationsniveau. Es wurden im Mittel für TCEB1 9,15 Genkopien (min: 5; max: 15) und für TMEM70 im Mittel 7,92 Genkopien (min: 4,5; max: 15) gefunden.

In den 13 amplifizierten Tumoren zeigten 7 Amplifikationen vom HSR-Typus und 6 Amplifikationen vom DM-Typus. Das Amplifikationsniveau war in Tumoren des HSR-Typus generell höher (6,67 Kopien) als beim DM-Typus (5,99 Kopien).

Das bereits in anderen Studien diskutierte 8q21-Amplikonzielgen WWP1 war in keinem Fall in der Amplifikation enthalten. Im Gegensatz dazu wurden Koamplifikationen von

TMEM70 und TPD52 – einem anderen mutmaßlichen 8q21 Zielgen – in 84,6 % der Tumoren gefunden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass TCEB1 und TMEM70 die Kerngene des von 71,49-86,17 Mb reichenden Amplikons auf 8q21 darstellen. Dieses Amplikon ist unabhängig von dem telomerisch gelegenen WWP1 Amplikon. Mindestens 58 Gene können in das Amplikon eingeschlossen sein. TCEB1 und TMEM70 sind aufgrund des relativ hohen Amplifikationsniveaus die möglicherweise besten Kandidaten für das tumorbiologisch relevante Gen dieses Amplikons.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg, 1998. *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2, Tumorerkrankungen*. 1. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1; 27; 50.
- 2: Müller M., et al., Hrsg, 2008/09. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. 4. Auflage, Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 61.
- 3: Levine A.J., (1995). *The genetic origins of neoplasia*. JAMA; 273(7), 592.
- 4: Schwab M., Amler L.C., (1990). *Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 1: 181-193.
- 5: Stark G.R., Wahl G.M., (1984). *Gene amplification*. Annu Rev Biochem, 53: 449.
- 6: Kulozik N.E., Hentze M.W., Hagemeyer C, Bartram CR, 2000. *Molekulare Medizin Grundlagen – Pathomechanismen – Klinik*. 1. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter, 321-323.
- 7: Al-Kuraya K., et al., (2004). *Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer*. Cancer Res; 64(23): 8534-40.
- 8: Rakó I., Downes C.S., (1995). *Genes in Medicine (Molecular biology and human genetic disorders)*. 1. Auflage, London: Chapman und Hall, 133-134.
- 9: Kurwahara Y., et al., (2004). *Alternative Mechanisms of Gene Amplification in Human Cancers*. Genes Chromosomes Cancer; 41: 125-132.
- 10: McClintock B., (1951). *Chromosome organization and genic expression*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 16: 13-47.
- 11: Murnane J.P., Sabatier L., (2004). *Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer*. Bioessays; 26: 1164-1174.
- 12: Rakó I., Downes C.S., (1995). *Genes in Medicine (Molecular biology and human genetic disorders)*. 1. Auflage, London: Chapman und Hall, 136.
- 13: Coquelle A., et al., (1997). *Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplifications*. Cell; 89: 215-225.
- 14: Murnane J.P., (2006). *Telomeres and chromosome instability*. DNA Repair (Amst); 5 (9-10): 1082-1092.
- 15: Shimizu N., et al., (2005). *When, where and how the bridge breaks: Anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation*. Exp. Cell Res; 302: 233-243.
- 16: Stark G.R., Wahl G.M., (1984). *Gene amplification*. Annu Rev Biochem, 53: 477-480.

- 17: Kröner HP., 2005. *Humangenetik*. In: Gerabek W.E., et al. Hrsg., Enzyklopädie der Medizingeschichte. 1.Auflage, Berlin: Walter de Gruyter, 639.
- 18: Winiwarter H., (1912). *Études sur la spermatogenese humaine*. Arch. biologie; 27: 91-189.
- 19: Painter T.S., (1923). *Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man*. J. Exp. Zoology; 37: 291-336.
- 20: Tjio J.H., Levan A., (1956). *The chromosome number of man*. Hereditas; 42: 1-6.
- 21: Lejeune J., Gautier M., Turpin M.R., (1959). *Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens*. C R Hebd Seances Acad Sci (Paris); 248:1721-1722.
- 22: Nowell P.C., Hungerford D.A., (1960). *A minute chromosome in human granulocytic leukemia*. Science; 132: 1497.
- 23: Caspersson T., et al., (1967). *Chemical differentiation along metaphase chromosomes*. Exp Cell Res; 49(1): 219-22.
- 24: Beckmann M.W., Dall P., Fasching P.A., Krüssel J.S., Niederacher D., Tutschek B., Hrsg. 2002. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde*, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 31-32.
- 25: Southern E.M., (1975). *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol.; 98(3): 503-517.
- 26: Knippers R., 2006. *Molekulare Genetik*, 9. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 322.
- 27: Janning W., Knust E., 2008. *Genetik. Allgemeine Genetik- Molekulare Genetik-Entwicklungsgenetik*, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 277.
- 28: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg. 2003. *Grundlagen der Molekularen Medizin. 2. Auflage* Heidelberg: Springer-Verlag, 408.
- 29: Gall J.G., Pardue M.L., (1969). *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A; 63(2): 378-383.
- 30: Manning J.E., et al., (1975). *A new method of in situ hybridization*. Chromosoma; 53(2): 107-17.
- 31: Beckmann M.W., Dall P., Fasching P.A., Krüssel J.S., Niederacher D., Tutschek B., Hrsg. 2002. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde*, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 32-35.
- 32: Mullis K., et al.,(1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 51 Pt 1: 263-273.
- 33: Hallbach J., 2006. *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 219.
- 34: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg. 2003. *Grundlagen der Molekularen Medizin. 2. Auflage* Heidelberg: Springer-Verlag, 409-413.

- 35: Janning W., Knust E., 2008. *Genetik. Allgemeine Genetik- Molekulare Genetik- Entwicklungsgenetik*, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 280-283.
- 36: Veres G., et al., (1987). *The molecular basis of the sparse fur mouse mutation*. Science; 237(4813): 415-417.
- 37: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg. 2003. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 2. Auflage Heidelberg: Springer-Verlag, 413.
- 38: Kallioniemi A., et al., (1992). *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science; 258: 818-821.
- 39: Ganten D., Ruckpaul K., Hrsg. 2003. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 2. Auflage Heidelberg: Springer-Verlag, 406.
- 40: Kulozik N.E., Hentze M.W., Hagemeyer C, Bartram CR, 2000. *Molekulare Medizin Grundlagen – Pathomechanismen – Klinik*. 1. Auflage, Berlin: Walter de Gruyter, 20/21.
- 41: Beckmann M.W., Dall P., Fasching P.A., Krüssel J.S., Niederacher D., Tutschek B., Hrsg. 2002. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde*, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 35-38.
- 42: Müller H.J., Röder T. 2004. *Der Experimentator Microarrays*. 1. Auflage, München: Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH, 1, 7, 8, 54.
- 43: Pease A.C., et al., (1994). *Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNS sequence analysis*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5022-5026.
- 44: Beckmann M.W., Dall P., Fasching P.A., Krüssel J.S., Niederacher D., Tutschek B., Hrsg. 2002. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde*, Darmstadt: Steinkopff Verlag, 54.
- 45: Henning W., 2002. *Genetik*, 3. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 788.
- 46: Forozan F., et al., (1997). *Genome screening by comparative genomic hybridization*. Trends Genet; 13(10): 405-409.
- 47: Tirkkonen M., et al., (1998). *Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH*. Genes Chromosomes Cancer; 21(3): 177-184.
- 48: Roylance R., et al., (1999). *Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer*. Cancer Res; 59(7): 1433-1436.
- 49: Liao D.J., Dickson R.B., (2000). *c-Myc in breast cancer*. Endocr Relat Cancer; 7(3): 143-164.
- 50: Fejzo M.S., et al., (1998). *Molecular cytogenetic analysis of consistent abnormalities at 8q12-q22 in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 22(2): 105-113.
- 51: Hyman E., et al., (2002). *Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer*. Cancer Res; 62(21): 6240-6245.

- 52: Marchio C., et al., (2008). *Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast*. J Pathol; 215(4): 398-410.
- 53: Rodriguez V., et al., (2007). *Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.
- 54: Balleine R.L., et al., (2000). *The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer; 29:48–57.
- 55: Chen C., et al., (2007). *The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer*. IntJ Cancer; 121:80–87.
- 56: Choschzick M., et al., (2010). *Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome*. Modern Pathology; 23(4): 603-610.
- 57: Wolfer A., et al., (2010). *MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state*. Proc Natl Acad Sci U S A; 107(8): 3698-3703.
- 58: Rodriguez V., et al., (2007). *Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.
- 59: Dziarski R, et. al., (2001). *MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components*. J Immunol. 2001 Feb 1; 166(3):1938-1944.
- 60: Cizkova V., et al., (2008). *TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy*. Nat Genet; 40: 1288-1290.
- 61: Houstek J., et al., (2009). *TMEM70 protein – A novel ancillary factor of mammalian ATP synthase*. Biochim Biophys Acta; 1787: 529-532.
- 62: Szatrowski TP., Nathan CF., (1991). *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res; 51: 794-798.
- 63: Santamaria G., et al., (2006). *Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase*. Carcinogenesis; 27: 925-935.
- 64: Panayiotidis M., (2008). *Reactive oxygen species (ROS) in multistage carcinogenesis*. Cancer Lett; 266: 3-5.
- 65: Chandel NS., et al., (1998). *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Nat. Acad Sci USA; 95: 11715-11720.
- 66: Chandel NS., et al., (2000). *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing*. J Biol Chem; 275: 25130-25138.

- 67:** Denko NC., (2008). *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nat Rev Cancer; 8: 705-713.
- 68:** Choschzick M., et al., (2010). *Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome*. Modern Pathology; 23(4): 603-610.
- 69:** Aso T., et al., (1995). *Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II*. Science; 269: 1439-1443.
- 70:** Jalava SE., et al., (2009). *TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells*. Int J Cancer; 124: 95-102.
- 71:** Sufan RI., et al., (2004). *The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma*. Am J Physiol Renal Physiol; 287: F1-F6.
- 72:** Porkka K., et al., (2002). *Amplification and overexpression of Elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays*. Lab Invest; 82: 629-637.
- 73:** Yin G., et al., (2006). *Cloning, characterization and subcellular localization of a gene encoding a human Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) homologous to the Arabidopsis thaliana UBC-16 gene product*. Front Biosci.; 11: 1500-1507.
- 74:** Boutros R., et al., (2004). *The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles*. Biochem Biophys Res Commun; 325(4): 1115-1121.
- 75:** Lewis JD., et al., (2007). *Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52*. Mol Cancer Res; 5(2): 133-144.
- 76:** Byrne JA., et al., (1995). *A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and identification of a novel complementary DNA sequence*. Cancer Research; 55: 2896-2903.
- 77:** Rubin MA., et al., (2004). *Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer*. Cancer Research; 64: 3814-3822.
- 78:** Byrne JA., et al., (2005). *Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer*. Int. J. Cancer; 117: 1049-1054.
- 79:** Balleine RL., et al., (2000). *The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer; 29: 48-57.
- 80:** Hicks J., et al., (2006). *Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer*. Genome Research; 16: 1465-1479.
- 81:** Shehata M., et al., (2008). *Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52*. Clin Cancer Res; 14(16): 5050-5060.
- 82:** Rodriguez V., et al., (2007). *Chromosome 8 bac array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer; 46: 694-707.

- 83:** Verdecia MA., et al., (2003). *Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase*. Mol Cell; 11(1): 249-259.
- 84:** Li Y., et al., (2009). *WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 targets the full-length ErbB4 for ubiquitin-mediated degradation in breast cancer*. Oncogene; 28(33): 2948-2958.
- 85:** Chen C., et al., (2007). *The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer*. Int. J. Cancer; 121: 80-87.
- 86:** Hijmans EM., et al., (1995). *E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo*. Mol Cell Biol.; 15(6): 3082-3089.
- 87:** Polanowska J., et al., (2000). *Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors*. Genes Chromosomes Cancer; 28: 126-130.
- 88:** Umemura S., et al., (2009). *Overexpression of E2F-5 correlates with a pathological basal phenotype and a worse clinical outcome*. Br J Cancer; 100(5): 764-771.
- 89:** Zhang Y., et al., (2006). *The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control*. Cell Res.; 16(1): 45-54.
- 90:** Pollack JR., et al., (2002). *Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A; 99(20): 12963-12968.
- 91:** Marchio C., et al., (2008). *Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast*. J Pathol; 215(4): 398-410.
- 92:** Pipiras, E., et al., (1998). *Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome*. EMBO J.; 17(1): 325-333.
- 93:** Debatisse M., et al, (1998). *Gene Amplification Mechanisms: The Role of Fragile Sites*. Recent Results in Cancer Research; 154: 216-226.
- 94:** Shimizu N., (2009). *Extrachromosomal Double Minutes and Chromosomal Homogeneously Staining Regions as Probes for Chromosome Research*. Cytogenet Genome Res; 124: 312-326.
- 95:** Polanowska J., et al., (2000). *Human E2F5 gene is oncogenic in primary rodent cells and is amplified in human breast tumors*. Genes Chromosomes Cancer; 28: 126-130.
- 96:** Melchor L., et al., (2005). *The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors*. Clin Cancer Res.; 11(24): 8577-8584.
- 97:** Marchio C., et al., (2008). *Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast*. J Pathol; 215(4): 398-410.

- 98:** Choschzick M., et al., (2010). Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Modern Pathology*; 23(4): 603-610.

## 7 Danksagung

Hiermit möchte ich abschließend noch meine tiefe Dankbarkeit gegenüber jedem, der mich während dieser Arbeit unterstützt hat, zum Ausdruck bringen. Allen voran dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf mit seinem Leiter Prof. Dr. med. Sauter, meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Simon und allen weiteren Mitarbeitern. Dabei möchte ich unter anderem die stets tatkräftige und geduldige Hilfe von Antje Krohn, Lia Burkhardt, Dr. Pierre Tennstedt und Malte Mader hervorheben.

Besonders möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, während der Laborarbeit, bei meiner fantastischen Arbeitsgruppe bedanken. Hier vor allem meiner Kommilitonin Marie Menslage und meinem Kommilitonen Kilian Rudolf.

Schlussendlich möchte ich mich zutiefst bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Eltern für die Hilfe durchs gesamte Studium und das mich unaufhörliche Motivieren in jeder Phase. Außerdem danke ich ausdrücklich meiner Schwester Madeleine für die vielen technischen Lösungsvorschläge und jedes aufbauende Gespräch. Abschließend danke ich besonders meinem Freund Denny Groch für die Geduld während der gesamten Zeit und seine Unterstützung von Anfang an.

## 9 Erklärung

### **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....