

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS, FRCS Ed. Hon.

HER2 und Chromosom 17 sowie Genomanalyse mittels komparativer genomischer Hybridisierung beim duktalen Pankreasadenokarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Andreas M. Lübke

aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 16.05.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Jakob R. Izbicki

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Guido Sauter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1	Epidemiologie des Pankreaskarzinoms..... 5
1.2	Risikofaktoren..... 5
1.3	Das klinische Bild des Pankreaskarzinoms..... 6
1.4	Entstehung des Pankreaskarzinoms und Vorläuferläsionen..... 6
1.5	Radiologie..... 6
1.6	Makroskopie..... 7
1.7	Mikroskopie..... 7
1.7.1	Histologie des normalen Pankreasgewebes..... 7
1.7.2	Histologie des duktales Pankreasadenokarzinoms..... 10
1.8	Therapie..... 15
1.8.1	Chirurgische Therapie..... 15
1.8.2	Adjuvante Therapie..... 16
1.9	Prognosefaktoren..... 16
1.10	Genomische Instabilität..... 17
1.11	Wesentliche Signalwege..... 17
1.12	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)..... 18
1.12.1	HER2 Grundlagen und Funktion..... 18
1.12.2	HER2 als Zielstruktur molekularer Therapien..... 18
1.12.3	HER2 beim Pankreaskarzinom..... 19
1.13	Zielsetzung..... 21
2. Material und Methoden	22
2.1	Patientenkollektive..... 22
2.1.1	Patientenkollektiv I (FISH, CISH und HER2-Immunhistochemie)..... 22
2.1.2	Patientenkollektiv II (CGH)..... 23
2.2	Schnittpräparate von Paraffinblöcken und Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... 23
2.3	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)..... 24
2.3.1	Vorbehandlung..... 24
2.3.2	Denaturieren und Hybridisierung..... 25
2.3.3	Waschvorgang nach Hybridisierung..... 25
2.3.4	Auswertung..... 26
2.4	Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH)..... 26
2.4.1	Vorbehandlung..... 26
2.4.2	Denaturieren und Hybridisierung..... 27
2.4.3	Waschvorgang nach Hybridisierung (Tabelle 4)..... 28
2.4.4	Immunhistochemische Detektion der Digoxigenin-markierten HER2 und Chromosom 17 Sonden..... 29
2.4.5	Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eindeckeln..... 29
2.4.6	Auswertung..... 30
2.5	HER2-Immunhistochemie..... 30
2.6	Statistische Auswertung der FISH, CISH und HER2- Immunhistochemie mit den klinischen Parametern..... 32
2.7	Lasermikrodissektion (Kollektiv II)..... 32
2.8	Single-cell-oligonucleotide-mediated-PCR (SCOMP)..... 35
2.8.1	Proteinase K-Verdau..... 35
2.8.2	Mse I-Verdau..... 36

2.8.3	LIB1 / ddMse Adapter.....	36
2.8.4	Ligation.....	37
2.8.5	Primäre PCR.....	37
2.8.6	Kontroll PCR.....	40
2.8.7	Gelelektrophorese.....	40
2.8.8	Markierungs-PCR.....	41
2.8.9	Abtrennung des LIB1 Primers.....	42
2.9	Metaphasenpräparation.....	43
2.10	Komparative genomische Hybridisierung (CGH).....	44
2.11	CGH Auswertung.....	47
2.12	Statistische Berechnungen.....	49
2.13	Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Geräte, Oligonukleotide, Primer, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, Puffer.....	50
3.	Ergebnisse.....	55
3.1	Vergleichende Analyse von FISH und CISH.....	55
3.2	Kopienzahl von Chromosom 17 (CISH).....	57
3.3	Überprüfung der Tumorploidie durch Untersuchung mittels weiterer Zentromersonden für Chromosom 7 und 8.....	58
3.4	HER2-Amplifikation beim duktalem Pankreasadenokarzinom.....	60
3.5	p185 ^{HER2} -Überexpression beim duktalem Pankreasadenokarzinom.....	61
3.6	p185 ^{HER2} -Überexpression in Lymphknotenmetastasen bei high-level HER2- Amplifikation.....	63
3.7	Einfluß der Chromosom 17 Aneuploidie, der HER2-Amplifikation und der p185 ^{HER2} -Überexpression auf das Überleben.....	64
3.8	Hybridisierungsbilder und Summenkaryogramme.....	67
3.9	CGH-Ergebnisse.....	71
3.10	Korrelation der CGH-Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern.....	72
3.11	Korrelation der CGH-Ergebnisse mit tumorspezifischem Überleben.....	73
4.	Diskussion.....	76
4.1	HER2 und Ploidie von Chromosom 17 beim duktalem Pankreasadenokarzinom.....	76
4.2	CGH beim duktalem Pankreasadenokarzinom.....	80
5.	Zusammenfassung.....	84
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	85
7.	Literaturverzeichnis.....	87
8.	Publikationsverzeichnis.....	95
9.	Danksagung.....	97
10.	Lebenslauf.....	99
11.	Eidesstattliche Versicherung	100

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom gehört zu den zehn häufigsten Tumorarten in Deutschland, mit einer Neuerkrankungsrate von knapp 15.000 Menschen im Jahr 2008. Das Pankreaskarzinom hat die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen und ist mit 6,3% aller Krebstodesfälle bei Männern sowie 7,5% bei Frauen die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 8% für Männer und bei 7% für Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 78 und für Frauen bei 76 Jahren [Robert Koch-Institut 2012]. Das duktale Pankreasadenokarzinom macht etwa 85% aller Pankreaskarzinome aus [Rosai 2004].

1.2 Risikofaktoren

Tabakrauch ist der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms, mit einem doppelt bis dreifach höheren Risiko der Krebsentstehung bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern [Iodice et al. 2008]. Auch der Konsum von rauchfreien Tabakprodukten führt zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms [IARC 2007]. Des Weiteren wird ein möglicher Zusammenhang mit Ernährungsgewohnheiten, Übergewicht, Bewegungsmangel, fettreicher Kost (insbesondere reich an gesättigten Fettsäuren) sowie ein geringer Anteil an Obst und Gemüse im Ernährungsplan diskutiert [World Cancer Research Fund 2007]. Die chronische Pankreatitis ist mit einem 10-fach höheren Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms assoziiert, insbesondere bei Patienten mit einer erblichen Pankreatitis [Lowenfels et al. 1999]. Außerdem besteht bei Diabetes mellitus (1,5 bis 2-fach) und einem Zustand nach Gastrektomie (3 bis 5-fach) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms [Anderson et al. 2006]. Etwa 20% der Pankreaskarzinome zeigen eine hereditäre Komponente, davon haben 5-10% eine positive Familienanamnese, und bei weiteren 10% ist ein erbliches Tumorsyndrom bekannt. Patienten mit hereditärem nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC) haben ein leicht erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms. Peutz-Jeghers-Patienten haben eine Wahrscheinlichkeit von 36% bis zum 70. Lebensjahr an einem Pankreaskarzinom zu erkranken [Hidalogo 2010, Chu et al. 2010].

1.3 Das klinische Bild des Pankreaskarzinoms

Symptome des Pankreaskarzinoms sind Rückenschmerzen, Gewichtsverlust, Ikterus und Pruritus [Holly et al. 2004]. 70% der Patienten zeigen einen Diabetes mellitus, welcher auch als Erstsymptom auftreten kann [Chari et al. 2005]. Symptome einer fortgeschrittenen Erkrankung können metastastisch bedingte Leberfunktionsstörungen sowie bei Durchbruch des Tumors in die Bauchhöhle mit Peritonealkarzinose das Auftreten von Aszites sein.

1.4 Entstehung des Pankreaskarzinoms und Vorläuferläsionen

Als Vorläuferläsionen für das duktales Pankreasadenokarzinom sind bislang die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) identifiziert, von denen die PanIN am häufigsten vorkommt. Alle drei haben ihren Ursprung im duktalem Epithel der Pankreasgänge und alle drei Vorläuferläsionen werden in jeweils drei Gruppen mit steigendem Dysplasiegrad unterteilt [Campman et al. 1997, Hingorani et al. 2003; Klöppel 1980; Sarnaik 2003, Schlitter und Eposito 2012, Van Den Berg et al. 2000, Zamboni et al. 1999]. Kürzlich wurde im Mausmodell eine weitere mögliche Vorläuferläsion, die sogenannte atypische flache Läsion (AFL) identifiziert, welche eine genetische Ähnlichkeit mit duktalem Adenokarzinomen des Pankreas aufweist und aus den zentroazinären-azinären Komplexen über sogenannte tubuläre Komplexe entstehen könnte [Aichler et al. 2012, Eposito et al. 2007]. Dieses könnte einen alternativen Weg zur Entstehung des duktalem Pankreasadenokarzinoms darstellen. Die AFL konnte bislang jedoch nur in Pankreata von Personen mit familiärer Pankreaskarzinomanamnese nachgewiesen werden [Eposito et al. 2012).

1.5 Radiologie

Die Computertomographie (CT) ist das Mittel der Wahl zur Darstellung des Pankreas. In bis zu 92% sind die duktalem Pankreasadenokarzinome als hypodense Raumforderungen zu erkennen [Bluemke et al. 1995, Kala et al. 2007, Nguyen und Leong 2008]. In 4% der Fälle besteht eine diffuse Tumordinfiltration. Ein frühes Zeichen kann ein abruptes Abbrechen des Pankreasganges oder eine prästenotische Gangdilatation sein [Gangi et al. 2004].

1.6 Makroskopie

Das duktales Pankreasadenokarzinom ist zu zwei Dritteln im Pankreaskopf und zu einem Drittel im Pankreascorpus und Pankreasschwanz lokalisiert. Die Tumore sind unscharf begrenzt, zeigen eine gräulich-gelbliche Schnittfläche und haben eine derbe Konsistenz (Abbildung 1). Multifokale Tumore bestehen in etwa 20% der Fälle. Das Pankreasgewebe distal des Tumors kann eine chronisch-fibrosierende Pankreatitis, eine Atrophie und dilatierte Gänge aufweisen [Rosai 2004].

1.7 Mikroskopie

1.7.1 Histologie des normalen Pankreasgewebes

Das exokrine Pankreasgewebe besteht aus Drüsenzini, die das Pankreassekret bilden, und Ausführungsgängen, die in den Azini-nahen Anteilen von einem kubischen und in den peripheren Anteilen von einem hochprismatischen Epithel ausgekleidet sind [Leonhardt 1990] (Abbildung 2). Im exokrinen Pankreas eingestreut befindet sich der endokrine Anteil des Pankreas, die Langerhansschen Inseln, welche zahlreiche Hormone produzieren (Insulin, Glucagon, Somatostatin, pankreatisches Polypeptid, Serotonin, vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP), GABA) [Leonhardt 1990] (Abbildung 3).



Abbildung 1: Auf dem Foto ist eine horizontale Schnittlamelle des Pankreas nach Formalinfixation dargestellt. Man erkennt den zentral gelegenen Pankreas-Hauptgang >, welcher von einem 1,7cm messenden grau-weißen und unscharf begrenzten Tumor # ummauert wird. Der Tumor hebt sich vom angrenzenden gelblichen und lobuliert aufgebauten Pankreasparenchym * ab. Peripher ist das peripancreatische Fettgewebe zu sehen ++. Randlich erkennt man im oberen Bildanteil eine rote Farbmarkierung für die spätere mikroskopische Identifikation des Schnitttrandes.

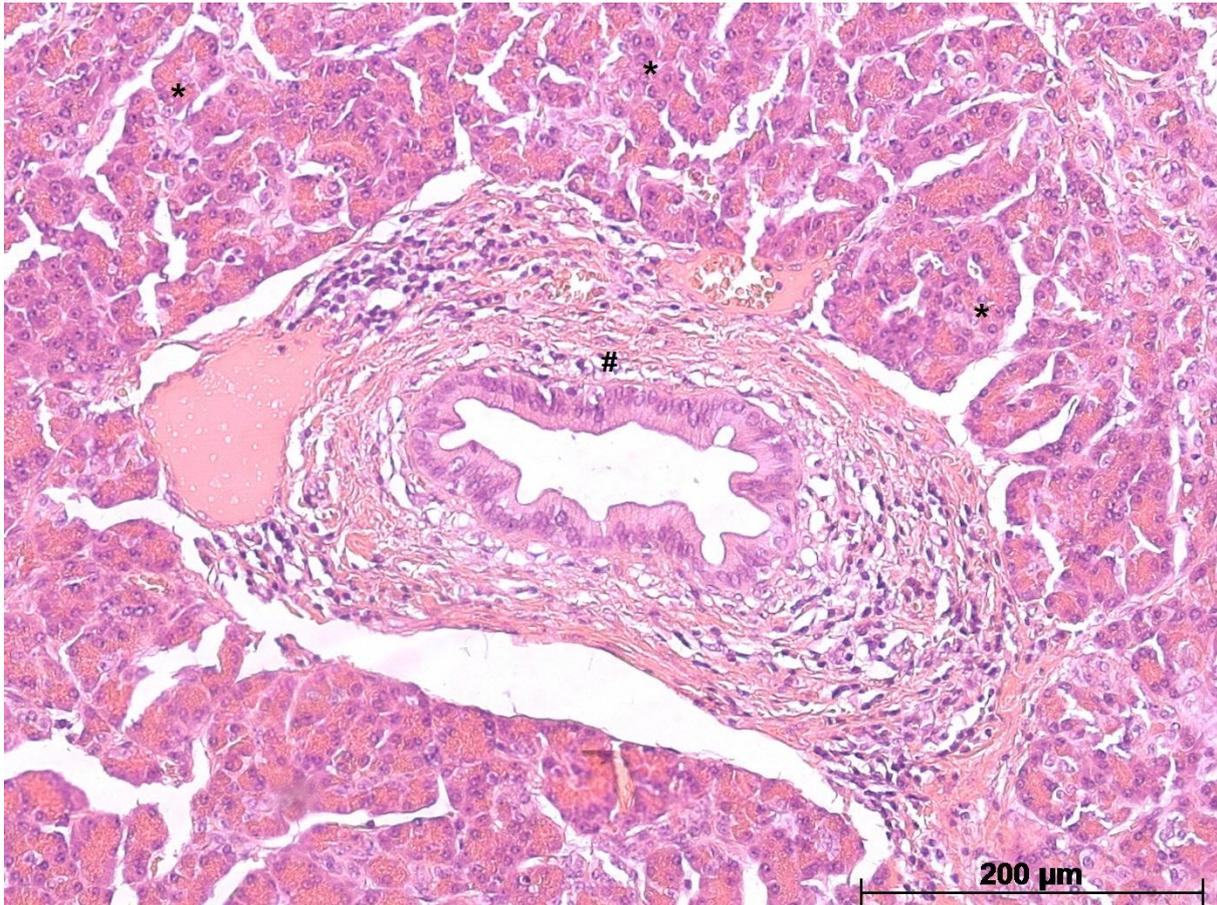
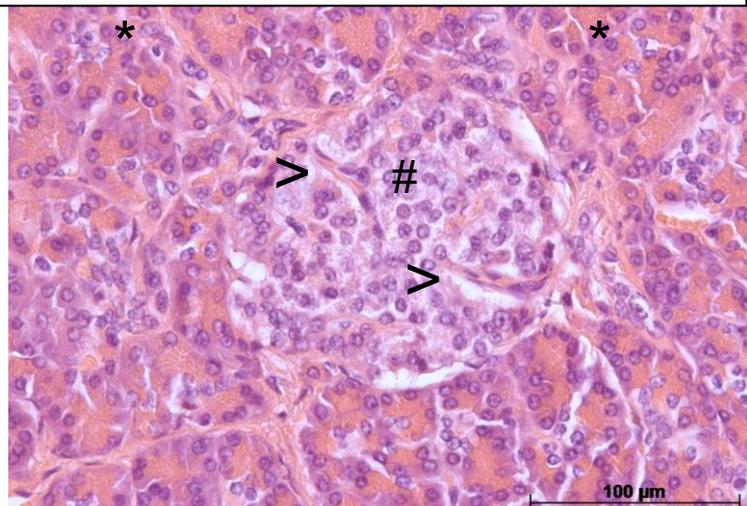


Abbildung 2 (HE): Zentral gelegen sieht man einen Ausführungsgang #, welcher von einreihigem hochprimatischem Epithel ausgekleidet ist. In der Umgebung kommen zahlreiche Drüsenzazini * mit eosinophilem Zytoplasma zur Darstellung.

Abbildung 3 (HE): In der Bildmitte befindet sich eine Langerhanssche Insel # mit einem zarten Kapillarnetz >. Die endokrinen Inseln sind vom exokrinen Pankreas * umgeben.



1.7.2 Histologie des duktales Pankreasadenokarzinoms

Histologisch werden die duktales Pankreasadenokarzinome nach WHO in gut, mäßig und niedrig differenzierte Karzinome eingeteilt [Bosman et al. 2010] (Tabelle 1).

	Drüsendifferenzierung	Muzinbildung	Mitosen/HPF	Kernmorphologie
Grad 1	gut differenziert	ausgeprägt	5	geringe Polymorphie, erhaltene Polarität
Grad 2	mäßig differenzierte gangartige Strukturen und tubuläre Komplexe	irregulär	6-10	mäßige Polymorphie
Grad 3	niedrig differenzierte Drüsen, abortives Mucoepidermoid und pleomorphe Strukturen	abortiv	>10	ausgeprägte Polymorphie und Vergrößerung

Gut differenzierte duktales Adenokarzinome haben eine wenig auffällige Drüsenarchitektur. Das Drüsenlumen ist weit und von einer oder wenigen Zellen eines kubischen oder zylindrischen Epithels ausgekleidet. Die Drüsen zeigen jedoch eine atypische Formung mit zum Teil spitz zulaufender Anordnung, umgeben von einem konzentrischen desmoplastischen Stroma [Iacobuzio-Donahue et al. 2002]. Zytologisch können die Tumorzellen bereits ein breites Spektrum an zellulären Atypien aufweisen. Die Diskrepanz zwischen ausgeprägten zytologischen Atypien und einer gering alterierten Drüsenarchitektur ist charakteristisch für die Karzinome der periampullären Region, zu denen auch das Pankreaskarzinom gehört [Longnecker und Terhune 1996]. Mäßig und niedrig differenzierte Karzinome zeigen eine zunehmende Entdifferenzierung der glandulären Architektur sowie hochgradige Kernatypien, mit vergrößerten und hyperchromatischen Nuclei, teils mit prominenten Nucleolen sowie abortiver Schleimbildung (Abbildungen 4 – 6).

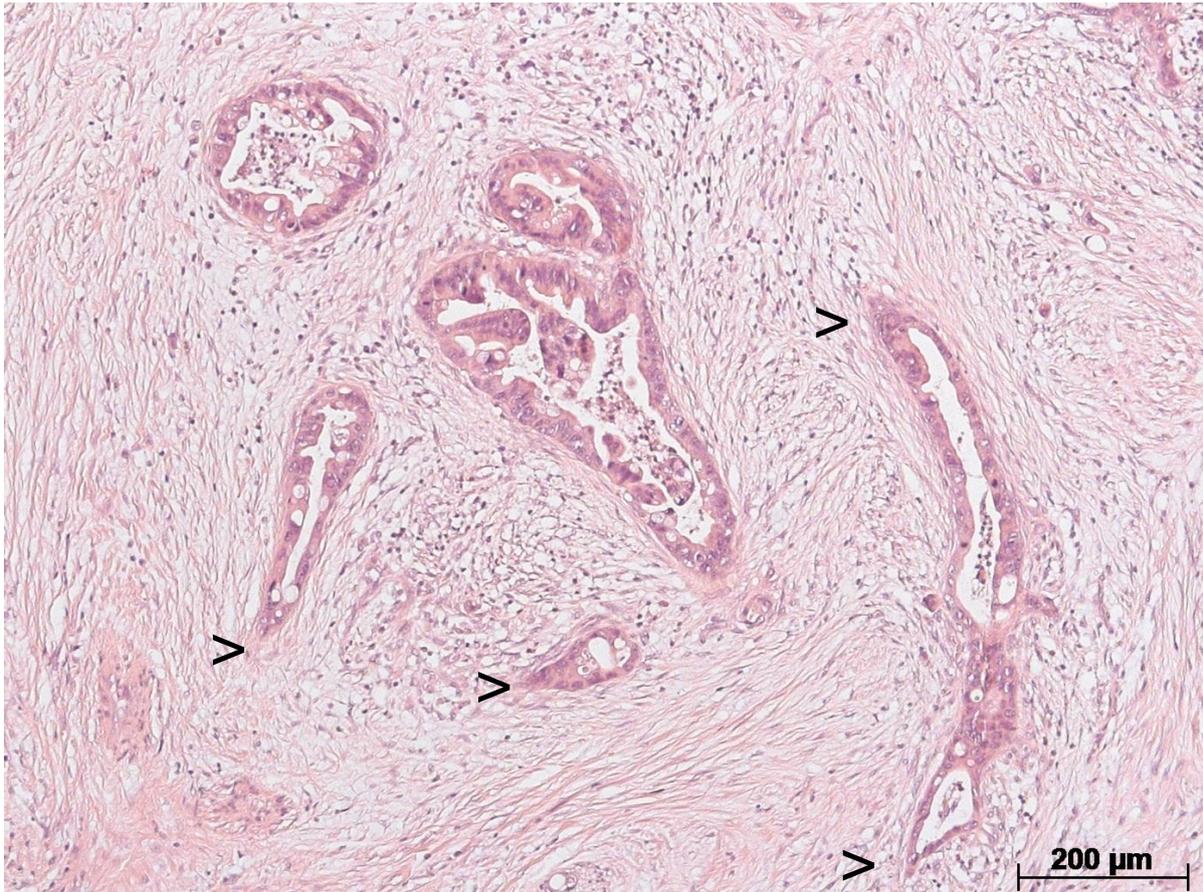


Abbildung 4a (HE): Gut differenziertes duktales Adenokarzinom (G1). Die in desmoplastischem Stroma gelegenen Gangstrukturen zeigen entgegen dem Aufbau normaler Gänge eine spitz zulaufende Architektur >. Auf zellulärer Ebene lassend sich bereits vergrößerte und hyperchromatische Zellkerne mit beginnendem Verlust der Polarität sowie Mitosefiguren erkennen.

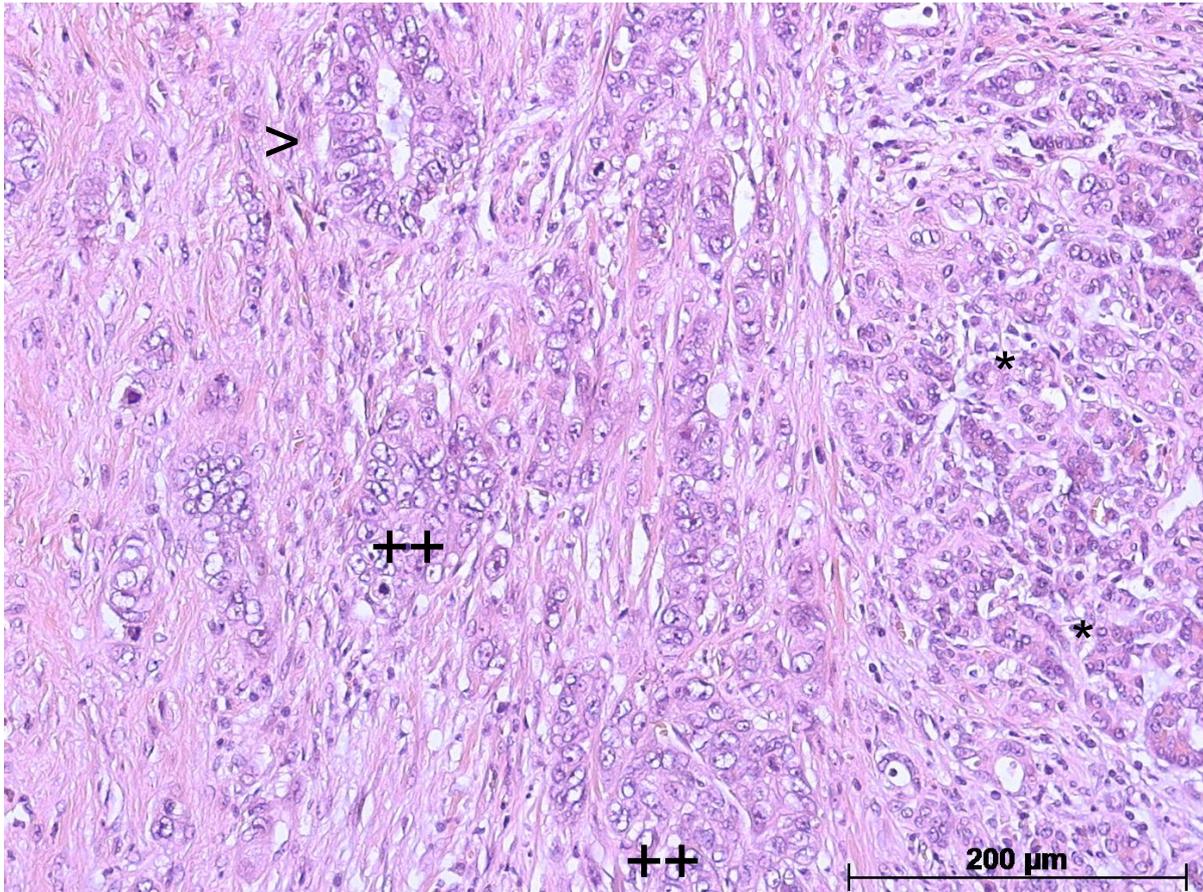
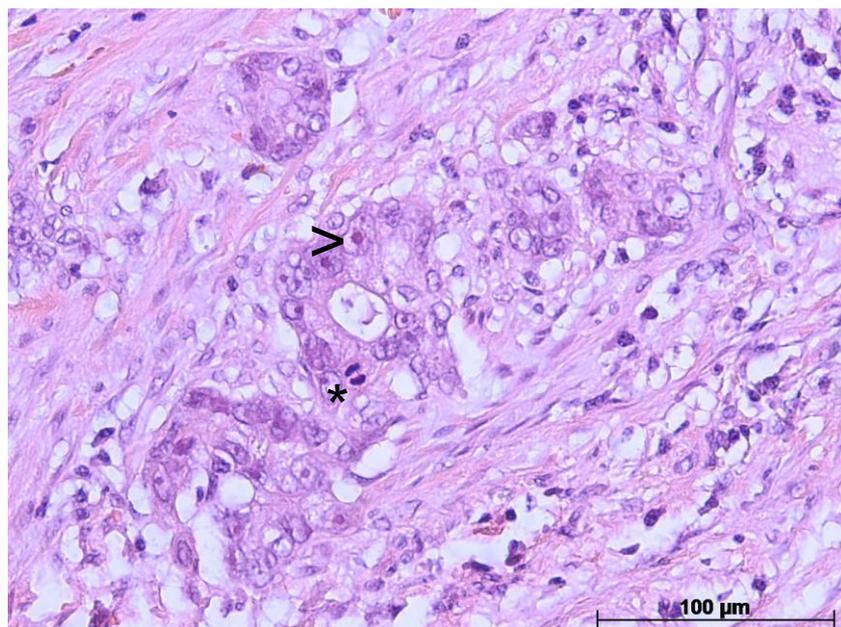


Abbildung 5a (HE): Mäßig differenziertes duktales Adenokarzinom (G2). Die drüsige Architektur des Tumors beginnt zu verschwimmen. Teils sieht man noch drüsig angeordnete Tumoranteile mit Lumenbildung >, teils kommen auch trabekuläre und kompakte Areale zur Darstellung ++. Auf der rechten Seite regressiv veränderte Pankreasazini *.

Abbildung 5b (HE): Die zellulären Atypien mit prominenten Nucleolen > und Kernpolymorphie werden gut erkennbar. Mitosefiguren sind leicht zu finden*.



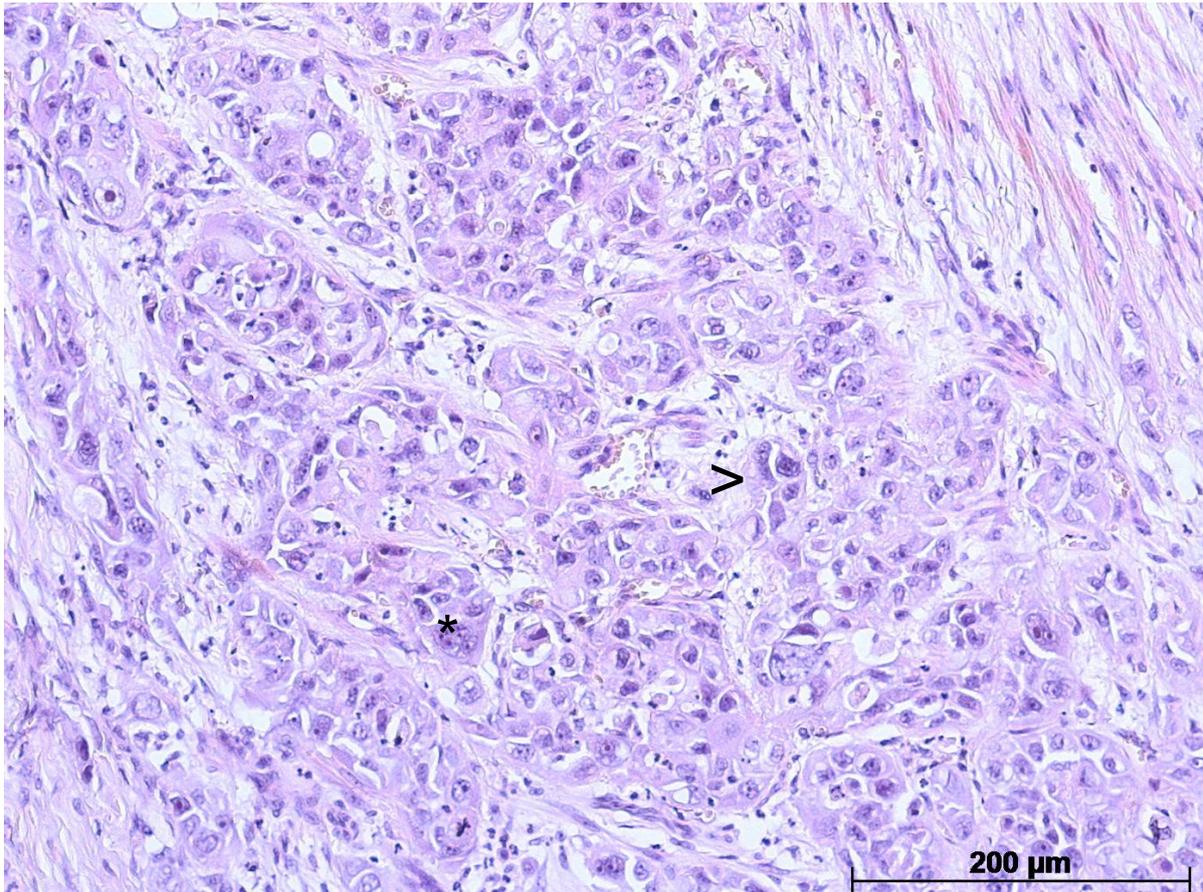


Abbildung 6a (HE): Niedrig differenziertes duktales Adenokarzinom (G3): Zunehmend entdifferenzierte Drüsenformationen mit teils bizarren Zellkernen > und abortiver Muzinbildung. Kaum ein Kern gleicht dem anderen, mehrkernige Tumorzellen sind nachweisbar *.

In etwa 90% der Fälle ist eine perineurale Tumoration nachweisbar. Dies ist eines der wenigen, wenn nicht sogar das einzige valide Kriterium für die Diagnose eines Pankreaskarzinoms in der intraoperativen Schnellschnittdiagnostik (neben dem Nachweis von sicher infiltrativem Wachstum oder dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen). Dennoch ist auch hier Vorsicht geboten, weil in pankreatischen Nervenfasern gutartige epitheliale Einschlüsse existieren [Costa J, 1977], und auch bei der chronischen Pankreatitis perineurale Extensionen von Inselzellen gefunden werden können [Bartow S et al. 1981]. Ferner stellen die Nervenfasern einen Korridor für ein extrapankreatisches Tumorwachstum dar.

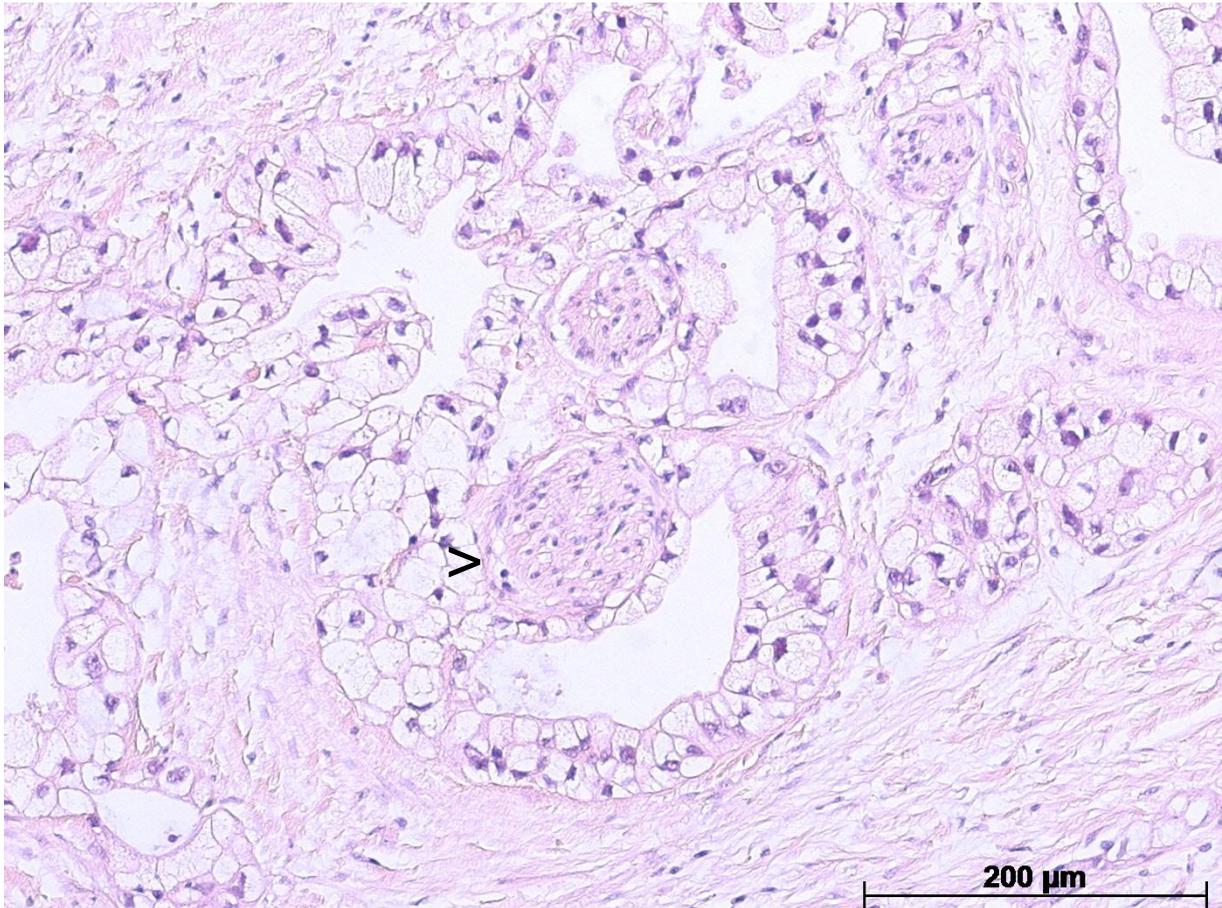


Abbildung 6b (HE): Perinaurale Tumordinvasion eines hier hellzelligen Karzinoms mit Ummauerung der Nervenfasern >.

Ein weiteres Charakteristikum des duktales Pankreasadenokarzinoms ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion, welche sich um die Tumorzellen ausbildet. Diese morphologische Besonderheit ist für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung, denn sie beeinflusst zum einen die Identifikation von Tumorzellen in der Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen erschwert sie die Isolation von „reinen“ Tumorzellen (Abbildung 7).

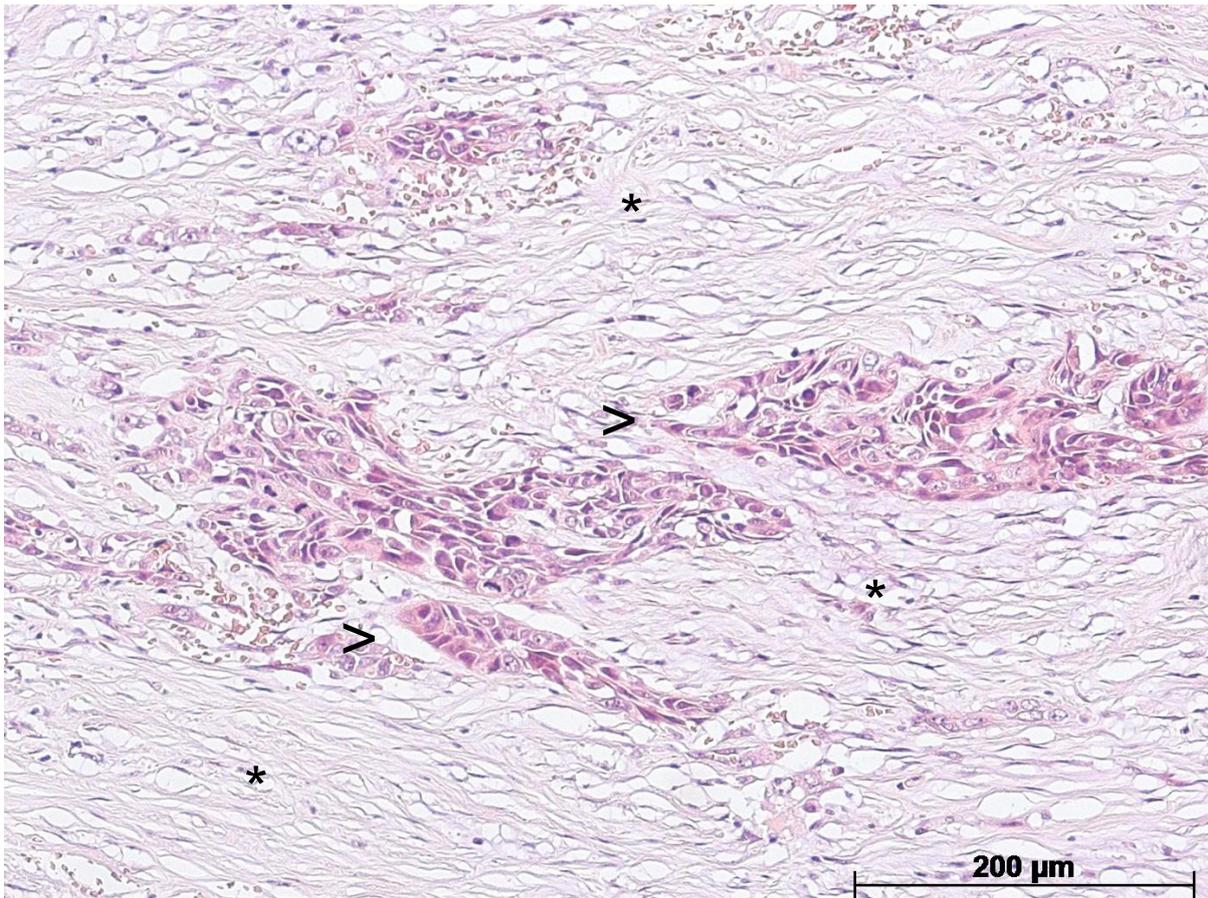


Abbildung 7: Ausbildung von mäßig zellreichem kollagenem Stroma * um die Tumorzellformationen >.

1.8 Therapie

1.8.1 Chirurgische Therapie

Bei Lokalisation eines malignitätsverdächtigen Pankreastumors im Pankreaskopf wird eine offene Pankreatoduodenektomie durchgeführt, bei der zwei Varianten möglich sind. Einerseits die klassische Kausch-Whipple-Operation mit Magenresektion, andererseits die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie (PPPD nach Longmire/Traverso) ohne Entfernung des Magenantrum und des Pylorus. Entscheidend für die Auswahl der Operationsmethode ist die Tumorausbreitung. Bezüglich Mortalität, Morbidität und Gesamtüberleben besteht zwischen den beiden Varianten kein Unterschied. Ziel der Pankreasresektion ist die vollständige En-bloc-Tumorresektion mit lokoregionärer Lymphadenektomie. Die Standardlymphadenektomie besteht in der Entfernung der Lymphknoten im Bereich des Pankreaskopfes, paraduodenal und im Ligamentum hepatoduodenale / A. hepatica communis. Die radikale Lymphadenektomie beinhaltet eine zusätzliche

Entfernung der Lymphknoten des Truncus coeliacus bis zur A. lienalis und entlang der V. und A. mesenterica superior. Die erweiterte radikale Lymphadenektomie sieht zusätzlich eine Entfernung des interaortokavalen Lymphknotenkompartimentes vor. Eine Infiltration venöser Gefäße wie z. B. der Pfortader oder der V. mesenterica superior stellt nach den S3-Leitlinien keinen Ausschluss für eine Resektion dar, und sollte vorgenommen werden, um eine R0-Situation zu erreichen. Bei Infiltration der arteriellen Gefäße wie des Truncus coeliacus und der A. mesenterica superior ist eine Resektion im Gesunden außerordentlich schwierig und die arterielle Resektion eine hoch individuelle Entscheidung. Gemäß den S3-Leitlinien ist bei Nachweis von Fernmetastasen eines duktales Pankreasadenokarzinoms die Resektion des Primärtumors nicht empfehlenswert. Die intraoperative Schnellschnittuntersuchung des Pankreasabsetzungsrandes ist empfehlenswert und im Falle einer venösen Gefäßresektion zum Erreichen einer R0-Resektion obligat [Adler et al. 2007, Distler und Grützmann 2012].

1.8.2 Adjuvante Therapie

Nach Resektion eines Pankreaskarzinoms wird die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU)/Leucovorin (LV) oder Gemcitabin gemäß der aktuellen S3-Leitlinie empfohlen, dabei unterscheiden sich die beiden Chemotherapeutika nicht [Oettle et al. 2007, Neoptolemos et al. 2009]. Eine geringe Verlängerung des Überlebens in palliativer Situation besteht für Gemcitabin in Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib [Moore et al. 2007]. Eine Indikation für eine neoadjuvante Therapie außerhalb von Studien besteht gemäß S3-Leitlinie nicht [Adler et al. 2007]

1.9 Prognosefaktoren

Bei Patienten mit operablem duktales Pankreasadenokarzinom sind der Status der Resektionslinien, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der Differenzierungsgrad von prognostischer Bedeutung. Insbesondere die Anzahl der positiven tumorbefallenen Lymphknoten hat bezüglich des Überlebens eine starke prognostische Aussagekraft [Riediger et al. 2009].

1.10 Genomische Instabilität

Das sporadische duktale Pankreasadenokarzinom zeigt in der Regel eine ausgeprägte chromosomale Instabilität, die einen bedeutenden Effekt auf die Entwicklung und Progression des Tumors hat [Bardeesy und De Pinho 2002, Gorunova et al. 1998, Mahlamäki et al. 2002, Harada et al. 2008, Harada et al 2009, Schleger et al. 2000, Bashyam et al. 2005]. Die chromosomale Instabilität ist definiert als eine vermehrte Anzahl an Gewinnen oder Verlusten ganzer chromosomaler Regionen oder größerer Abschnitte eines Chromosoms, welche zu einem veränderten Karyotyp mit Heterogenitäten zwischen den einzelnen Tumorzellen [Lengauer et al. 1998, Pino und Chung 2010], einer aberranten Chromosomenzahl (Aneuploidie) und strukturellen chromosomalen Alterationen führen. Als Hauptursache der chromosomalen Instabilität wird die Verkürzung der Telomere angenommen, durch die sowohl an den Stellen von chromosomalen Umlagerungen als auch an chromosomalen Bruchpunkten durch Ausbildung von Bruch-Fusion-Brücken-Zyklen (breakage-fusion-bridge cycles / BFB cycles) Amplifikationen und Deletionen entstehen [Artandi et al. 2000, DePinho 2000, Maser und DePinho 2002]. Verkürzungen der Telomere konnten schon in über 90% der frühen Vorläuferläsionen des duktales Pankreasadenokarzinoms (PanIN-1A Läsionen) nachgewiesen werden und scheinen die Entwicklung von KRAS- und p53-Mutationen zu fördern [van Heek et al. 2002]. Außerdem wurden Amplifikationen der Zentromerregionen und Defekte des Spindelzellapparates beim duktales Pankreasadenokarzinom nachgewiesen, welche ebenfalls zur chromosomalen Instabilität beitragen [Shono et al. 2001, Sato et al. 2001].

1.11 Wesentliche Signalwege

Jones et al. konnten mittels Sequenzierung von 24 duktales Pankreasadenokarzinomen die Gene der zwölf wesentlichen Prozesse und regulatorischen Signalwege identifizieren [Jones et al. 2008]. Im Einzelnen sind dies der TFG β -Pathway, der JNK-Pathway, die Integrin-Kaskade, der Wnt-Notch-Pathway, der Hedgehog-Pathway, die Regulation der G1/S Transition, die Apoptoseregulation, die Kontrolle der DNA-Schäden, die small-GTPase Signalkaskade, die Invasionsregulation, Zelladhäsionsmoleküle und der KRAS-

Signalweg. Häufig sind bei der Signaltransduktion Mitglieder der EGFR-Familie beteiligt, von denen das HER2-Protein (p185^{HER2}) das biologisch bedeutendste ist.

1.12.1 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

p185^{HER2} wurde zuerst bei in Mäusen induzierten Neuroblastomen nachgewiesen [Shih et al. 1981]. Später konnten von mehreren Gruppen das humane Homolog und die Gensequenz identifiziert werden [Coussens et al. 1985, Semba et al. 1985]. Der HER2-Rezeptor ist ein 185kDa schweres Protein und gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (epidermal growth factor receptor family (EGFR)), die durch drei funktionelle Domänen charakterisiert sind: Eine extrazelluläre Cystin-reiche Ligandenbindungsstelle, eine Transmembran-Brücke und ein intrazytoplasmatischer Tyrosinkinaseanteil [Hynes et al. 2001]. Das codierende HER2-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (Chr.17q12-21.32) lokalisiert. Die EGFR-Familie bildet aus den Proteinen HER1, HER2, HER3 und HER4 Homo- und Heterodimere, von denen die Dimere unter Beteiligung von p185^{HER2} die stärkste Ligandenbindungsaffinität und die potenteste Signalverstärkung aufweisen. Die HER-Dimere sind ein zentrales Element des komplexen ErbB-Signalnetzwerkes, mit zahlreichen Liganden und Effektormolekülen, welche zur Aktivierung von MAP-Kinasen führen und somit Wachstumssignale in die Zelle weiterleiten [Tzahar und Yarden 1998].

1.12.2 HER2 als Zielstruktur molekularer Therapien

Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab ist gegen die extrazelluläre Domäne des HER2-Proteins gerichtet und wurde zuerst in der Behandlung von Patientinnen mit p185^{HER2}-Überexpression beim metastasierten Mammakarzinom in Kombination mit Cisplatin eingesetzt. Das Resultat des Therapieansprechens war besser als mit Cisplatin allein [Pegram et al. 1998]. Inzwischen ist die Bestimmung des HER2-Status beim Mammakarzinom fester Bestandteil der histopathologischen Aufarbeitung und die Behandlung mit Anti-HER2 Substanzen (Trastuzumab und Lapatinib) eine wichtige Säule des onkologischen Behandlungskonzeptes [Deutsche Krebsgesellschaft 2012]. Auch beim fortgeschrittenem Magenkarzinom oder Karzinomen des Gastro-ösophagealen Übergangs besteht die Empfehlung, bei HER2-positiven Tumoren Trastuzumab einzusetzen [Bang et al. 2010].

1.12.3 HER2 beim Pankreaskarzinom

Das HER2-Protein könnte für Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom eine mögliche therapeutische Zielstruktur für monoklonale Antikörper darstellen und möglicherweise die sehr schlechte Prognose verbessern. Zu Beginn der Dissertation bestand bezüglich der p185^{HER2}-Überexpression beim Pankreaskarzinom mit berichteten Häufigkeiten von 1%-80% eine kontroverse Datenlage (Tabelle 2).

Yamanaka et al. berichteten eine Überexpression in 34 von 76 Pankreaskarzinomen. Ein sowohl zytoplasmatisches als auch membranöses Färbemuster wurde berichtet, und eine p185^{HER2}-Überexpression wurde ab einer Färbeintensität von +1 klassifiziert [Yamanaka et al. 1993]. In einer Serie von 19 Patienten beschrieben Day et al. eine p185^{HER2}-Überexpression bei 11 Patienten (69%), allerdings wurde auch hier eine Färbeintensität von +1 als Überexpression gewertet [Day et al. 1996]. 1997 untersuchten Dugan et al. ein Kollektiv von 79 Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom. Unter Einschluss schwacher und fokaler Färbung zeigten 63 von 79 Tumoren eine HER2-Proteinüberexpression (80%); bei ausschließlicher Einbeziehung der mäßigen und starken Färbungen lag der Anteil an positiven Tumoren bei 46 (58%) von 79 [Dugan et al. 1997]. Koeppen et al. zeigten unter Verwendung des HercepTests mit dem polyklonalen rabbit-anti-human Antikörper A0485 in einer Serie von 99 Adenokarzinomen des Pankreas (duktales Pankreasadenokarzinome, Gallengangskarzinome und Karzinome der Papilla Vateri) einen einzigen Fall mit starker p185^{HER2}-Überexpression (1%). 2002 berichteten Koka et al. eine Häufigkeit von 16% p185^{HER2}-Überexpression in einem Kollektiv von 308 Patienten mit Pankreasadenokarzinom [Koka et al., 2002].

Die erste Studie, die sowohl die p185^{HER2}-Überexpression als auch die Häufigkeit der HER2-Genamplifikation untersuchte zeigte eine Überexpression von p185^{HER2} (HercepTest 2+ oder 3+) bei 32 von 154 untersuchten Pankreasadenokarzinomen (21%). Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden 11 der 32 Patienten mit p185^{HER2}-Überexpression auf eine HER2-Genamplifikation untersucht, davon zeigten 3 von 11 eine HER2-Amplifikation; diese Patienten hatten einen HercepTest Score von 2+. Die drei Patienten mit einem HercepTest Score von 3+ waren nicht HER2 amplifiziert. Eine Stärke der Studie war die relativ große Patientenzahl und die standardisierte Erhebung der p185^{HER2}-Expression mittels des HercepTests. Limitiert wurde die Aussagekraft durch teils sehr kleine Gewebeproben aus Stanzbiopsien,

außerdem durch die Tatsache, dass bei dieser retrospektiven Studie einige Patienten eine vorangegangene Therapie erhalten hatten, und die nur unvollständige Erhebung des HER2-Genstatus (11 von 154) [Safran et al. 2001].

Studienlage zur HER2 Proteinüberexpression 2004

Tabelle 2

Studie	Jahr	Anzahl / HER2 Überexpression (%)	Antikörper
Yamanaka et al.	1993	34 / 76 (45%)	monoclonal mouse antiserum for human c-neu (Oncogene Science, Inc, Manhasset, N, U.S.A.)
Day et al.	1996	11 / 19 (69%)	Monoclonal mouse anti human (rmn4D5) (Genentec Inc., San Francisco, CA, U.S.A)
Dugan et al.	1997	63 / 79 (80%)	Monoclonal mouse anti human IgG c-erbB-2 (extrazelluläre Domäne) Triton Diagnostics, Alameda, CA, U.S.A
Koeppen et al.	2001	1/99 (1%)	Rabbit polyclonal anti-human (A0485, Dako, USA)
Safran et al.	2001	32 / 154 (21%)	Rabbit polyclonal anti-human (A0485, Dako, USA)
Koka et al.	2002	48 / 308 (16%)	Rabbit polyclonal anti-human (A0485, Dako, USA)

Zusammenfassend existierte vor den eigenen Untersuchungen lediglich eine Arbeit, bei der sowohl die p185^{HER2}-Überexpression als auch die HER2-Genamplifikation beim duktalem Pankreasadenokarzinom untersucht wurden. Ferner handelten es sich in den vorangegangenen Arbeiten zur p185^{HER2}-Expression um teils heterogene Kollektive, welche nicht ausschließlich aus duktalem Pankreasadenokarzinomen bestanden. Außerdem ist aufgrund der unterschiedlichen Antikörper, die insbesondere in den ersten Studien verwendet wurden, ein Vergleich nur bedingt möglich. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass der HercepTest zwar eine standardisierte histologische Auswertung ermöglicht, der polyklonale Antikörper

A0485 jedoch neben einer membranständigen Färbung auch eine zytoplasmatische Reaktion aufweist und somit möglicherweise nur ein HER2 assoziiertes Protein detektiert [Harder et al. 2012].

1.13 Zielsetzung

Als erstes sollte die Häufigkeit der p185^{HER2}-Überexpression und der HER2-Genamplifikation an einem Kollektiv von Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom bestimmt werden. Parallel sollte der Chromosom 17 Status erhoben werden, um eine echte Genamplifikation von einer Chromosom 17 Polysomie zu unterscheiden. Dazu sollte zuerst die Methode der Chromogen-in-situ Hybridisierung (CISH) im Labor etabliert werden. Die Ergebnisse sollten danach auf eine mögliche Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und Nachbeobachtungsdaten überprüft werden.

Als es sich zeigte, dass die Aneusomie von Chromosom 17 ein unabhängiger prognostischer Faktor wäre, wurden zur Bestätigung der Aussagekraft des Chromosom 17 Status bei einem Teil der Tumore ergänzende Ploidieuntersuchungen für Chromosom 7 und 8 durchgeführt.

Durch den prognostisch relevanten Einfluss der Ploidie erschien es aussichtsreich, das gesamte Genom der duktalem Pankreasadenokarzinome auf weitere Aberrationen hin zu untersuchen, die von biologischer und prognostischer Bedeutung sein könnten. Die Methode der Wahl stellte die komparative genomische Hybridisierung dar, welche eine umfangreiche Übersicht über alle genomischen Veränderungen in einem Experiment erlaubt. Auch hier sollte die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und Nachbeobachtungsdaten erfolgen sowie eine Einspeisung der genomischen Daten in eine Referenzdatenbank.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektive

2.1.1 Patientenkollektiv I (FISH, CISH und HER2-Immunhistochemie)

Das untersuchte Patientenkollektiv für den ersten Teil der vorliegenden Studie für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), die Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) und die HER2-Immunhistochemie bestand aus 50 Patienten, bei denen eine partielle Pankreatikoduodenektomie und radikale Lymphadenektomie mit kurativer Intention in der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde. Bei allen Patienten wurde die Diagnose histopathologisch gesichert. Zuvor wurde die Erhebung der klinischen und pathologischen Daten von der Ethikkommission genehmigt. Als Ausgangsmaterial dienten die in Paraffin eingebetteten, formalinfixierten Gewebeproben des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Zweiundzwanzig Patienten waren weiblich (44%), achtundzwanzig männlich (56%). Das mediane Alter der Patienten betrug 58 Jahre (Spannweite 33 – 82 Jahre). Die Tumore wurden nach der sechsten Ausgabe der UICC (International Union against Cancer) nach TNM klassifiziert [Sobin und Wittekind 2002]. Drei Tumore wurden als pT1 (6%), fünfundzwanzig als pT2 (50%) und zweiundzwanzig als pT3 (44%) klassifiziert. Fünfundzwanzig Patienten (50%) hatten Lymphknotenmetastasen (pN1). Kein Patient der Studie zeigte eine Fernmetastasierung (M0). Sechszwanzig Patienten (52%) wurden als G2 und vierundzwanzig Patienten (48%) als G3 klassifiziert. Die Resektionsränder von 49 Patienten waren tumorfrei. 41 Patienten wurden in die Berechnung der Überlebensanalysen einbezogen. Die übrigen 9 Patienten wurden wegen stattgefundener adjuvanter Chemotherapie (1), intraoperativem Versterben (2), und inkompletten Nachbeobachtungsdaten (weniger als 3 Monate nach OP-Datum) (6) ausgeschlossen. Die mediane Überlebenszeit betrug 13 Monate (Spannweite 3 bis 99 Monate).

2.1.2 Patientenkollektiv II (CGH)

Das zweite Patientenkollektiv für die genetischen Untersuchungen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) bestand aus 52 Patienten, bei denen eine partielle Pankreatikoduodenektomie und radikale Lymphadenektomie mit kurativer Intention in der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurden. Alle Patienten wurden im Gesunden (R0) reseziert. Bei allen Patienten wurde die Diagnose histopathologisch gesichert und zuvor die Erhebung der klinischen und pathologischen Daten von der Ethikkommission genehmigt.

Dreiundzwanzig Patienten waren weiblich (44%), neunundzwanzig männlich (56%). Das mediane Alter der Patienten betrug 60,2 Jahre (Spannweite 33 – 82 Jahre). Die Tumore wurden nach der sechsten Ausgabe der UICC (International Union against Cancer) nach TNM klassifiziert (Sobin und Wittekind 2002). Ein Tumor wurde als pT1 (2%), fünfundzwanzig als pT2 (48%), fünfundzwanzig als pT3 (48%) und ein Tumor als pT4 (2%) klassifiziert. Dreiunddreißig Patienten (63%) hatten Lymphknotenmetastasen (pN1). Keiner der in der Studie eingeschlossenen Patienten zeigte eine Fernmetastasierung (M0). Siebenundzwanzig Patienten (52%) wurden als G2 und fünfundzwanzig Patienten (48%) als G3 klassifiziert. Von 50 Patienten lagen vollständige klinische Nachbeobachtungsdaten vor. Zwei Patienten verstarben während des Klinikaufenthaltes aufgrund anderer Ursachen und wurden von der Nachbeobachtungsanalyse ausgeschlossen. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 14,5 Monate.

2.2 Schnittpräparate von Paraffinblöcken und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden mittels Mikrotom 5µm dicke Schnitte angefertigt, auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht und über Nacht bei 59°C gebacken. Von jedem Präparat wurde ein Schnitt Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dazu wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, schrittweise mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, mit Hämatoxilinlösung gefärbt, in Leitungswasser gebläut, mit Eosin gegengefärbt, schrittweise in aufsteigender Alkoholreihe differenziert und dehydriert, in Xylol überführt und mittels Eukitt mit Deckgläschen eingedeckelt (Tabelle 1).

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 1

Xylol	2 x 10 min	Entparaffinierung
Ethanol 100%	2 x 5 min	Rehydratation
Ethanol 96%	2 x 5 min	
Ethanol 80%	1 x 5 min	
Aqua dest	1 x 1 min	Färbung
Hämatoxylin-Lösung	1 x 5 min	
Aqua dest	1 x 1 min	
Leitungswasser	1 x 10 min	
Eosin-Lösung 0,1 %	1 x 5 min	
Ethanol 80%	1 x 5 min	Dehydratation
Ethanol 96%	2 x 5 min	
Ethanol 100%	2 x 5 min	
Xylol	2 x 5 min	Konservierung
Eukitt	Eindeckeln	

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde der PathVysion HER2 DNA Sonden-Kit verwendet, der eine gleichzeitige zweifarbige Hybridisierung des HER2 Genlocus und der alpha-Satelliten-Region von Chromosom 17 ermöglicht.

2.3.1 Vorbehandlung

Zur Hybridisierung wurden 5 µm dicke Schnitte des in Paraffin eingebetteten Materials mittels Mikrotom angefertigt, auf silanisierte Objektträger gebracht und über Nacht bei 59°C gebacken. Die Hybridisierung wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Vorbehandlung gibt Tabelle 2.

Vorbehandlung der Schnittpräparate für die FISH

Tabelle 2

Xylol	2 x 10 min	Entparaffinierung
Ethanol 100 %	2 x 5 min	
Lufttrocknen der Präparate	1 x 30 min	
Citratpuffer pH 6.0 Raumtemperatur	1 x 1 min	Vorbehandlung
In Citratpuffer in der Mikrowelle kochen	1 x 1 min	
1 mol Natrium-Isothiocyanat-Lsg. (6,49g auf 80 ml Aqua dest)	1 x 10 min 80°C	
Pepsin (2mg/ml) – HCl-Lösung (0,2m)	1 x 5 min	Proteolytische Behandlung
PBS pH 7,4	3 x 2 min	Dehydratation und Trocknung
Ethanol 80 %	1 x 2 min	
Ethanol 96 %	2 x 2 min	
Ethanol 100 %	2 x 2 min	
Lufttrocknen	1 x 30 min	

2.3.2 Denaturieren und Hybridisierung

Danach erfolgte die Denaturierung der Objektträger über 5 min in einer mittels Wasserbad auf 72°C vorgeheizten Lösung aus 70% Formamid und 2xSSC Puffer, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0 in einer Glasküvette. Unmittelbar danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe auf Raumtemperatur überführt und luftgetrocknet. Danach wurden 10µl der zuvor gevortexten, zentrifugierten und auf 37°C vorgewärmten Sondenlösung auf die Präparate aufgebracht und sofort mit einem Deckglas abgedeckt. Die vorübergehende Versiegelung erfolgte mit Fixogum entlang des Deckglasrandes. Die versiegelten Präparate wurden dann in eine Hybridisierungskammer überführt und in einem Wasserbad bei 37°C über Nacht (18 Stunden) hybridisiert.

2.3.3 Waschvorgang nach Hybridisierung

Nach vorsichtigem manuellen Entfernen des Fixogums wurden die Deckgläser in einem Waschpuffer (2xSSC, 0,3% NP40, pH 7,0) bei Raumtemperatur abgewaschen, danach für 2 min in einer Glasküvette mit auf 72°C vorgeheiztem

Waschpuffer (2xSSC, 0,3% NP40, pH 7,0) getaucht und anschließend im Dunkeln luftgetrocknet. Es erfolgte dann die Eindeckelung mit Vectashield-Konservierungslösung mit DAPI-Gegenfärbung.

2.3.4 Auswertung

Die Hybridisierung wurde mit einem Leica DMRA Fluoreszenzmikroskop durchgeführt und pro Präparat wurden die Fluoreszenzsignale in mindestens 60 intakten Interphasekernen ausgewertet. Zunächst wurden der chromosomale Index (CI) für Chromosom 17 und der copy number index (CNI) für HER2 bestimmt. Der chromosomale Index ist definiert als die durchschnittliche Kopienzahl eines Chromosoms pro Kern im ausgewerteten Präparat. Analog dazu beschreibt der copy number index die durchschnittliche Anzahl der Kopien eines bestimmten Gens pro Kern. In einer normalen diploiden Zelle beträgt der erwartete Wert für den CI und den CNI 2,0; in Gewebeschnitten liegt dieser Wert durch die Trunkierung der Zellkerne darunter. Eine Amplifikation des HER2-Genes wurde durch die Bestimmung des Quotienten aus Anzahl der Signale für das HER2-Gen, geteilt durch die Anzahl der Signale der Zentromere von Chromosom 17 errechnet. Quotienten mit einem Wert von weniger als 2,0 wurden als nicht amplifiziert, Werte zwischen 2,0 und 5,0 als low-level amplifiziert und Werte von mehr als 5,0 als high-level Amplifikation klassifiziert.

2.4 Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH)

2.4.1 Vorbehandlung

Die CISH für Chromosom 17 und HER2 wurde an konsekutiven Schnitten von 5µm Dicke der in Paraffin eingebetteten Tumorblöcke durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht (18h) bei 59°C gebacken. Eine Übersicht über die Vorbehandlung gibt Tabelle 3.

Vorbehandlung der Schnittpräparate für die CISH

Tabelle 3

Xylol	2 x 10 min	Entparaffinierung
Ethanol 100 %	2 x 5 min	
Lufttrocknen der Präparate	1 x 30 min	
Citratpuffer pH 6.0 Raumtemperatur	1 x 1 min	Vorbehandlung
Im Puffer in der Mikrowelle kochen	1 x 1 min	
1 mol Natrium-Isothiocyanat-Lösung. (6,49g auf 80 ml Aqua dest)	1 x 10 min 80°C	
Pepsin (2mg/ml) – HCl-Lösung (0,2m) individualisierte Zeit und Konzentration	1 x 5 min	Proteolytische Behandlung
PBS pH 7,4	3 x 2 min	Dehydratation und Trocknung
Ethanol 80 %	1 x 2 min	
Ethanol 96 %	2 x 2 min	
Ethanol 100 %	2 x 2 min	
Lufttrocknen	1 x 30 min	

Nach Entparaffinierung der Präparate erfolgte die Dissoziation der die DNA umgebenden Proteine durch Kochen der Schnittpräparate in 10mmol/L Citratpuffer in einer Mikrowelle mit einer Leistung von 720 W für 60 Sekunden. Danach wurden die Objektträger in eine 1 molare Natrium-Isothiocyanat-Lösung von 80°C überführt und dort für 10min inkubiert. Anschließend erfolgte eine proteolytische Behandlung in einer Pepsin-HCl Lösung, deren Konzentration und Dauer für jedes einzelne Präparat individuell optimiert wurde (siehe auch Tabelle 3).

Danach erfolgte ein Waschen in PBS-Puffer, gefolgt von einer schrittweisen Dehydrierung in einer standardisierten aufsteigenden Alkoholreihe und einer Trocknung bei Raumtemperatur.

2.4.2 Denaturieren und Hybridisierung

Die Präparate wurden auf einer Heizplatte für 10 min bei 80°C vorgeheizt. Die gebrauchsfertige HER2-Sonde wurde nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren auf 37°C vorgewärmt, jeweils 10µl der Sonde auf ein Hybridisierungsareal aufgebracht und sofort mit einem Deckglas abgedeckt. Die vorübergehende Versiegelung erfolgte

2. Material und Methoden

mit Fixogum entlang des Deckglasrandes. Die versiegelten Präparate wurden dann für weitere 10 min auf einer Heizplatte bei 85°C denaturiert. Das Procedere für die Chromosom 17 Sonde erfolgte analog mit dem Unterschied, dass zuvor 5µl des Sondenkonzentrates in 10µl des Hybridisierungspuffers Hybrisol VI gelöst wurden und die Denaturierung bei 80°C erfolgte. Beide Sonden inkubierten anschließend für 2 Tage in einer feuchten Kammer im Wasserbad bei 37°C.

2.4.3 Waschvorgang nach Hybridisierung

Tabelle 4

HER-2		
2xSSC bei Raumtemperatur	5 min	Abwaschen des Deckglases
0,5xSSC bei 66°C	5 min	Abwaschen der nicht gebundenen Sonde
PBS/Tween 0,025% bei Raumtemperatur	3 x 2min	
Chromosom 17		
2xSSC bei Raumtemperatur	5 min	Abwaschen des Deckglases
50%Formamid in 2xSSC bei 40°C	10 min	Abwaschen der nicht gebundenen Sonde
PBS bei Raumtemperatur	3 x 2min	

2.4.4 Immunhistochemische Detektion der Digoxigenin-markierten HER2 und Chromosom 17 Sonden

Tabelle 5

Immunhistochemische Detektion bei Raumtemperatur		
Goat-Serum 10% in PBS	1 x 10min	Blocken der unspezifischen Antigene für den Sekundärantikörper
Mouse-anti-Digoxigenin in 1% BSA/PBS	1 x 45min	Primärantikörper und Blocken unspezifischer Antigene
PBS	3 x 3 min	Waschen des Primärantikörpers
Biotin-SP-conjugated Goat-anti-mouse	1 x 30 min	Sekundärantikörper
PBS	3 x 3 min	Waschen des Sekundärantikörpers
Peroxidase-conjugated Streptavidin	1 x 30 min	Tertiärantikörper mit Detektionsenzym
PBS	3 x 3 min	Abwaschen überschüssiger Tertiär-Antikörper
Metal-enhanced Diaminobenzidin (DAB)	1 x 10 min	Färbung
Aqua dest	3 x 2 min	Spülen der Präparate

2.4.5 Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eindeckeln

Tabelle 6

Gegenfärbung und Eindeckeln		
Aqua dest	1 x 1 min	Färbung
Hämatoxylin-Lösung	1 x 1 min	
Aqua dest	1 x 1 min	
Leitungswasser	1 x 10 min	
Ethanol 80%	1 x 5 min	Dehydratation
Ethanol 96%	2 x 5 min	
Ethanol 100%	2 x 5 min	
Xylol	2 x 5 min	Konservierung
Eukitt	Eindeckeln	

Im Unterschied zur konventionellen Hämatoxylinfärbung wurde bei der Gegenfärbung für die Sondendetektion eine kürzere Zeit (1min) für die Inkubation mit dem Farbstoff gewählt, um die Sondensignale hervorzuheben. Die Hybridisierungen für Chromosom 7 und 8 wurden analog zur Hybridisierung von Chromosom 17 durchgeführt.

2.4.6 Auswertung

Für die Auswertung der Hybridisierungssignale der CISH wurde ein Zeiss Axioplan Mikroskop verwendet. Die Auszählung erfolgte bei 400- und 1000-facher Vergrößerung. Für jede Zielstruktur (Chromosom 7,8,17 und HER2) wurden die Signale von mindestens 200 Kernen ausgewertet. Die Bestimmung der HER2-Amplifikation erfolgte analog zur FISH-Auswertung.

Für die Bestimmung der Ploidie von Chromosom 17 wurde den Empfehlungen von Medelin [Medelin et al. 1999] gefolgt. Ein Tumor wurde als monosom für Chromosom 17 klassifiziert, wenn mehr als 50% der untersuchten Kerne kein oder ein Signal zeigten. Tumore wurden als disom, trisom oder tetrasom klassifiziert, wenn mindestens 20% der ausgezählten Kerne zwei, drei oder vier Signale zeigten. Wenn in mindestens 10% der ausgezählten Nuclei mehr als vier Signale vorhanden waren, wurde der Tumor als hypertetrasom klassifiziert. Eine kurze Übersicht gibt Tabelle 7.

Klassifikation nach Medelin et al.

Tabelle 7

	CISH - Signale	
Monosom	0 oder 1	> 50% der Kerne
Disom	2	≥ 20% der Kerne
Trisom	3	≥ 20 % der Kerne
Tetrasom	4	≥ 20 % der Kerne
Hypertetrasom	>4	≥ 10% der Kerne

2.5 HER2-Immunhistochemie

Zur Bestimmung der HER2-Proteinexpression wurde der DAKO HercepTest verwendet. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurde die Analyse an 5µm dicken, frisch geschnittenen, zuvor formalinfixierten (Fixationszeit 24-48h) und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten

2. Material und Methoden

Kontrollschnitte mit drei pelletierten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Zelllinien mit bekannter p185^{HER2}-Expression (Tabelle 8).

Tabelle 8

Zelllinie	Hercep-Score der p185 ^{HER2} -Expression
MDA-231	0
MDA-175	1+
SKBR-3	3+

Als Isotypkontrolle diente die Immunglobulin G-Fraktion aus dem Kaninchen (DAKO negative control reagent, normal rabbit immunoglobulin G fraction).

Der DAKO HercepTest wurde nach einem Scoring-System ausgewertet, das die Färbung von p185^{HER2} in vier Grade von 0 bis 3+ einteilt (Tabelle 9).

HercepTest Scoring-System

Tabelle 9

Score	p185 ^{HER2} -Expression	Färbeergebnis
0	negativ	Keine Färbung oder weniger als 10% der Tumorzellen sind angefärbt. Der Grad der Färbung ist bei weniger als 10% unbedeutend.
1+		Leichte membranständige Färbung in mehr als 10% der Tumorzellen.
2+	positiv	Leichte bis mittlere membranständige Färbung in mehr als 10% der Tumorzellen.
3+		Kräftige Färbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10 % der Tumorzellen.

Zeigten die Tumoren ein Färbeergebnis von 0 oder 1+, so wurde die p185^{HER2}-Expression als negativ klassifiziert. Zeigten die Tumoren ein Ergebnis von 2+ oder 3+, wurde dies als Überexpression gewertet.

2.6 Statistische Auswertung der FISH, CISH und HER2-Immunhistochemie mit den klinischen Parametern

Der exakte Test nach Fisher (Fisher's exact test) wurde verwendet um zu überprüfen, ob sich zwei Gruppen in Bezug auf eine Eigenschaft signifikant unterscheiden. Der Mann-Whitney-Test wurde als Rangsummentest zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen mit nicht-parametrischer Datenverteilung verwendet.

Der Kruskal-Wallis Test wurde angewendet, wenn drei oder mehr unabhängige Gruppen von Daten miteinander verglichen wurden. Für den Vergleich von gepaarten nicht-parametrischen Daten wurde der Wilcoxon Test verwendet. Die Kaplan-Meier Analyse wurde benutzt, um das rezidivfreie Überleben und das tumorfreie Gesamtüberleben zu berechnen. Für vergleichende Analysen wurde der log-rank Test verwendet.

Zur multivariaten Datenanalyse wurde die komplexeste Modellrechnung (mit den Variablen Chromosom 17 Aneuploidie, pT-Stadium, pN-Stadium, Differenzierungsgrad des Tumors, Alter und Geschlecht) mit Akaike Informationskriterium (Akaike information criterion, AIC) durchgeführt. Je kleiner das AIC ausfällt, desto besser erklärt das Modell den Datensatz. Außerdem wurde das proportionale Hazardmodell nach Cox angewendet [Burnham et al. 2002]. Ein p-Wert von <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Datenanalyse wurde mit der SAS statistical Software, der SPSS Software und der R Software durchgeführt.

2.7 Lasermikrodissektion (Kollektiv II)

Für die Lasermikrodissektion wurden konsekutive Schnitte von 5µm Dicke des paraffin-eingebetteten Tumorgewebes angefertigt. Ein Schnitt wurde, wie unter 2.2 beschrieben, mit Hämatoxylin gefärbt. Ein weiterer Schnitt wurde für die Laser-Mikrodissektion auf eine 1,35-µm dünne Polyethylenmembran, die auf einem Objektträger fixiert war, aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank bei 59°C gebacken. Nachfolgend wurden die auf Folie aufgezogenen Schnittpräparate entparaffiniert und mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt (siehe Tabelle 10).

Vorbehandlung für die Laser-Mikrodissektion

Tabelle 10

Xylol (im Schüttler)	2 x 15 min	Entparaffinierung
Ethanol 100%	2 x 5 min	Rehydratation
Ethanol 85%	2 x 5 min	
Ethanol 70%	1 x 5 min	
Aqua dest	1 x 1 min	Färbung
Hämatoxylin-Lösung (50%)	1 x 5 min	
Aqua dest	1 x 1 min	
Leitungswasser	1 x 10 min	
Ethanol 80%	1 x 5 min	Dehydratation
Ethanol 96%	2 x 5 min	
Ethanol 100%	2 x 5 min	
Raumtemperatur	über Nacht	Trocknung

Für die Laser-Mikrodissektion wurde das P.A.L.M. Laser-Microbeam System verwendet. Die Innenseite des Deckels eines 200µl Eppendorf-Tubes wurde mit 3 µl PCR-Öl gefüllt und über den auf Folie gezogenen Schnittpräparaten plziert. Danach wurden die Tumorareale präzise aus dem Stromagewebe mittels Laser herausgeschnitten und anschließend mit einem weiteren Laserimpuls in den Tubedeckel katapultiert (Abbildung 1).

Ablauf der Lasermikrodissektion in Bildern

Abbildung 1

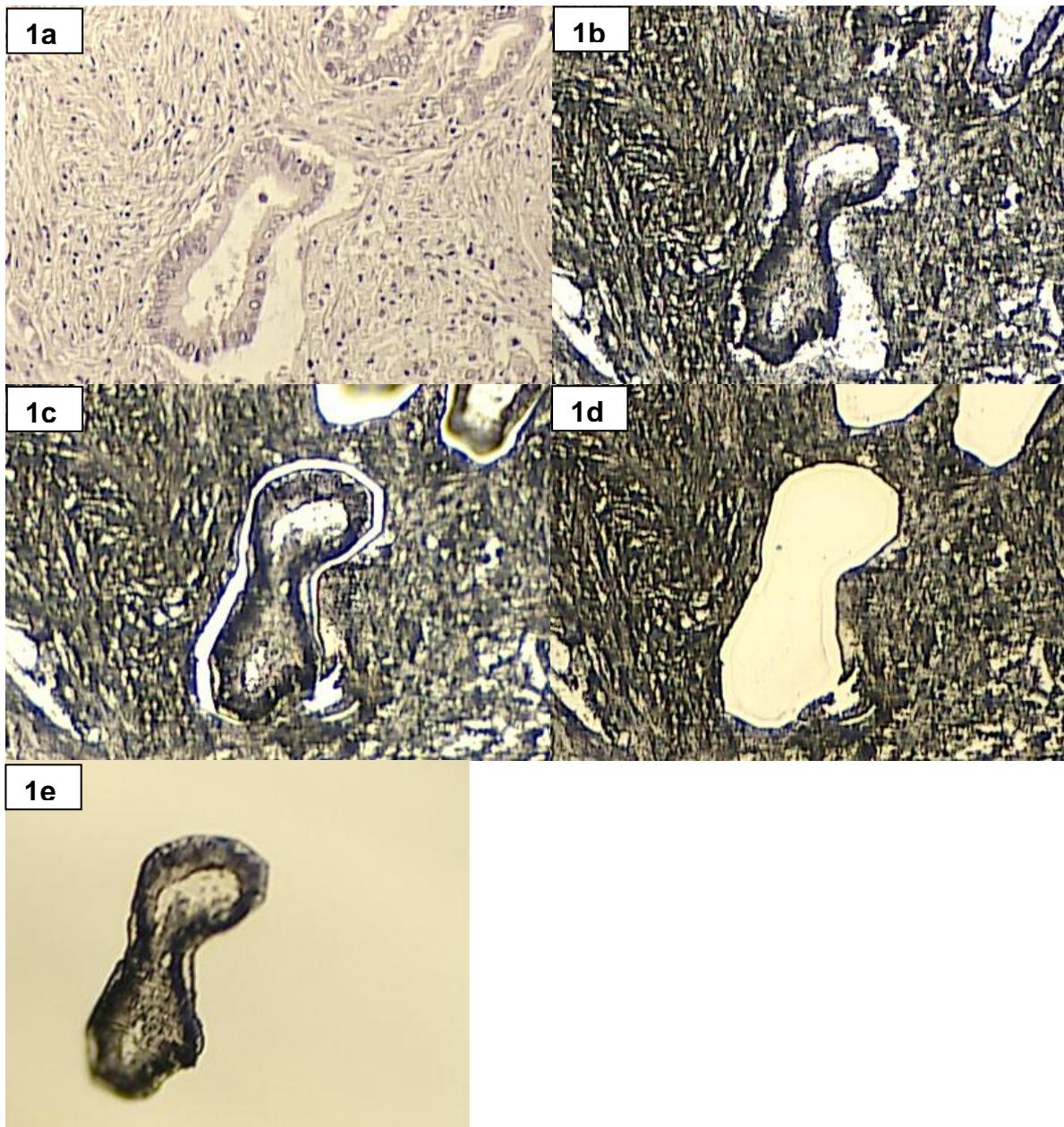


Abbildung 1: Man sieht in Abb. 1a eine in desmoplastischem kollagenfaserreichem Stroma gelegene Tumordrüse mit fixationsbedingten Schrumpffartefakten gegenüber dem Stroma. Abb. 1b zeigt das Bild eines auf Polyethylenmembran aufgebrauchten konsekutiven Schnittpräparates mit weiteren Anteilen der Tumordrüse. Abb. 1c zeigt das Präparat nach zirkumferentieller Exzision. Abb. 1d zeigt den Zustand nach Katapultierung der Tumordrüse mittels Laserimpuls in den Tubedeckel. In Abb. 1e sieht man die isolierte Tumordrüse im PCR-Öl des Tubedeckels schwimmen.

Ein wichtiges technisches Detail besteht darin, dass bei der Lasermikrodissektion mit dem P.A.L.M. Gerät keine thermische Energie freigesetzt wird, welche die später zu untersuchende DNA denaturieren und die folgende PCR somit empfindlich stören könnte. Anschließend wurde das Eppendorf-Tube verschlossen und das PCR-Öl mit dem enthaltenen Tumorgewebe auf den Boden des Tubes herunterzentrifugiert (5 Minuten, 14.000 Upm).

2.8 Single-cell-oligonucleotide-mediated-PCR (SCOMP)

2.8.1 Proteinase K-Verdau

Um die DNA für die PCR von den umgebenden Proteinen freizulegen, wurde ein Verdau mittels Proteinase K durchgeführt. Zu dem isolierten Tumorgewebe wurden 200µl gepufferte Proteinase K Lösung hinzugegeben (Tabelle 11), mittels eines Vortexers 1 Minute lang vermischt und anschließend erneut für 5 Minuten bei 14.000 Upm herunterzentrifugiert, so dass sich das Tumorgewebe in der Proteinase K Lösung befand und von einer Schicht aus PCR-Öl bedeckt war. Dies ist bei den sehr kleinen Volumina der Vorbereitungsansätze und des PCR-Ansatzes von protektiver Bedeutung, um einer Verschiebung der Konzentrationen durch Verdunstung von Wasser während des PCR-Vorgangs entgegenzuwirken.

Proteinase K-Lösung

Tabelle 11

OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
Tween 10%	0,13 µl
Igepal 10%	0,13 µl
Proteinase K 10 mg/ml	0,26 µl
H ₂ O	1,28 µl
Gesamtvolumen	2,0 µl

Der Proteinase K-Verdau wurde nun in einer PCR-Maschine für 10 Stunden bei 42°C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Deaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten bei 80°C.

2.8.2 Mse I-Verdau

Die Single-cell-oligonucleotide-mediated-PCR (SCOMP) wurde exakt nach dem Protokoll von Stoecklein [Stoecklein et al. 2002] durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Fragmentierung der DNA mit dem Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle T¹TAA) bei 37°C für 3 Stunden (Ansatz Mse I Verdau siehe Tabelle 12), gefolgt von einer Inaktivierung des Mse I Enzyms bei 65°C für 5 Minuten (siehe auch Diagramm 1).

Mse I-Verdau Ansatz

Tabelle 12

Proteinase K Lösung (inaktiviert)	2,0 µl
H ₂ O OnePhorAll plus Puffer	0,2 µl
Mse I 50 U/µl	0,2 µl
H ₂ O	1,6 µl
Gesamtvolumen	4,0 µl

2.8.3 LIB1 / ddMse Adapter

Das Mse I Enzym erzeugt 5' TA-Überhänge, an die ein Adapter ligiert wurde, welcher aus den Oligonucleotiden LIB1 und ddMse11 besteht (Ansatz siehe Tabelle 13). Zunächst werden die zwei Oligonucleotide zusammen in der PCR-Maschine mit einem programmierten Gradienten inkubiert. Von der Anfangstemperatur von 65°C erfolgte eine Abkühlung auf 15°C in Schritten von jeweils einer Minute. Dabei gingen die Oligonucleotide eine Basenpaarung ein.

LIB1 und ddMse Ansatz

Tabelle 13

LIB1 100µM	0,5 µl
ddMse11 100µM	0,5 µl
OnePhorAll plus Puffer	0,5 µl
H ₂ O	1,5 µl
Gesamtvolumen	3,0 µl

2.8.4 Ligation

Nun wurde der Mse I verdaute Ansatz zu dem LIB1 / ddMse Adapter gegeben, 1 µl DNA-Ligase (5 Units) sowie 1 µl ATP 10 mM hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 15°C über Nacht ligiert.

2.8.5 Primäre PCR

Am nächsten Tag wurden zu dem Ansatz DNA-Polymerase und Nucleotide hinzugefügt (Tabelle 14)

Primäre PCR Ansatz

Tabelle 14

Ligationsansatz	9,0µl
Expand-Long-Template PolMix 3,5 U/µl	1,0 µl
10 mM dNTP	2,0 µl
Expand-Long-Template Puffer	3,0 µl
H ₂ O	35 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Dann erfolgte die primäre PCR in der PCR Maschine nach folgendem Programm:

Primäre PCR Programm

Tabelle 15

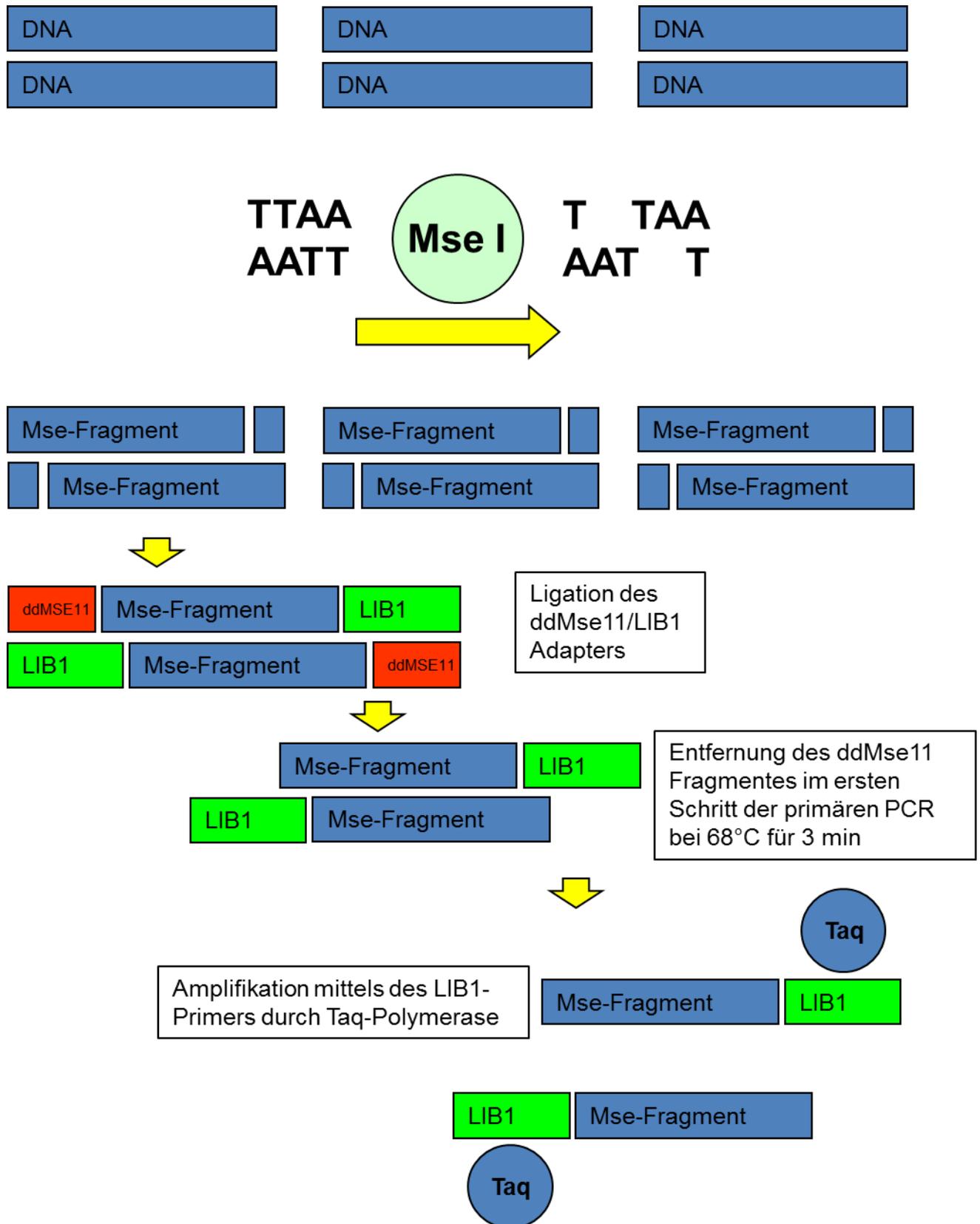
Temperatur	1 Zyklus	15 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 sec	40 sec	40 sec	
57°C – 65°C		57°C 30 sec	57°C 30 sec + 1°C / Zyklus	65°C 30 sec	
68°C	3 min	1 min 30 sec + 1 sec / Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec / Zyklus	1 min 53 sec + 1 sec / Zyklus	3 min 40 sec

2. Material und Methoden

Im ersten Zyklus der primären PCR wurde das kleinere Oligonucleotid ddMse11 bei 68°C für 3min abdenaturiert. Danach sind die Bindungsstellen des LIB1-Primers frei für die Amplifikation durch die Taq-Polymerase. Das Diagramm 1 zeigt die einzelnen Schritte der Oligonucleotide-mediated-PCR in der Übersicht. Das PCR Produkt ist bei -20°C stabil und wurde als Ausgangsmaterial für die Markierungs-PCR verwendet.

Oligonucleotide-mediated-PCR (Mse-Adapter PCR)

Diagramm 1



2.8.6 Kontroll PCR

Zur Qualitätskontrolle des Amplifikats wurde eine Kontroll-PCR angeschlossen, bei der spezifische genomische Mse I-Fragmente nachgewiesen wurden. In der vorliegenden Studie wurden die Kontrollgene α -Catenin, Plakoglobin, p53 Exon 2/3 und CK19 verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Programm geben die Tabellen 16 und 17 wieder.

PCR-Ansatz Kontroll-PCR

Tabelle 15

PCR-Puffer (10 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, dNTP 1 mM)	1,0 μ l
3` Primer	0,5 μ l
5` Primer	0,5 μ l
BSA	0,25 μ l
Taq-Polymerase 5 U/ μ l	0,1 μ l
H ₂ O	7,75 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

PCR-Programm Kontroll PCR

Tabelle 17

Temperatur	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
58°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

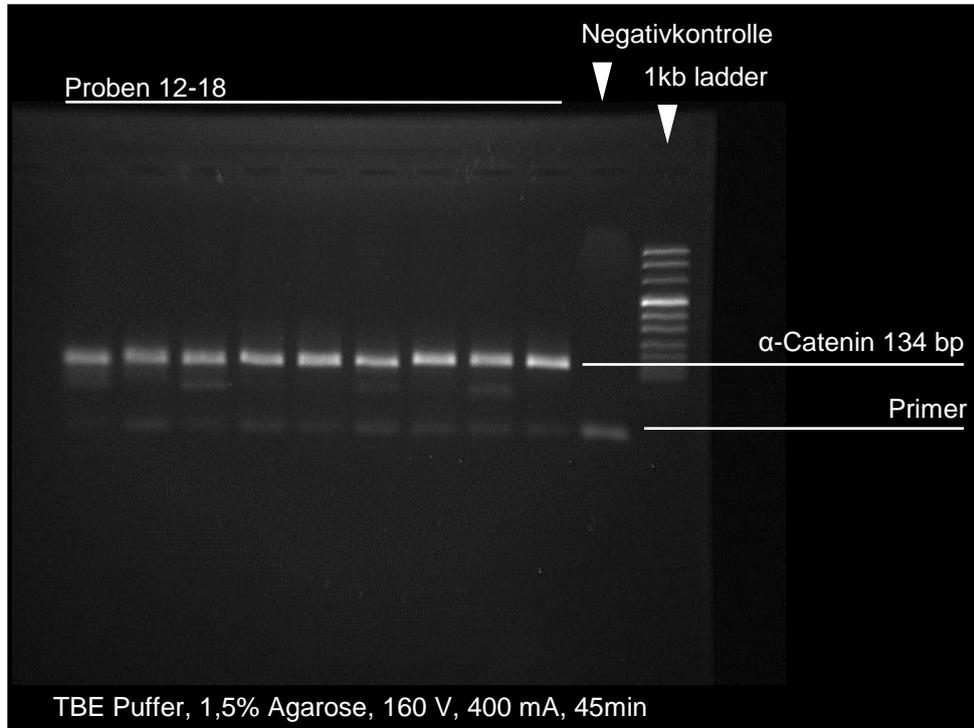
2.8.7 Gelelektrophorese

Die PCR Produkte wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Für das Gel wurde TBE-Puffer verwendet, in welchem 1,5% Agarose gelöst wurden. Die 10 μ l des PCR-Produktes wurden mit 1 μ l Sybr-Gold (1:1600 verdünnt) sowie 2 μ l Dye (0,3% Orange G, 25% Ficoll in TBE-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden dann in einem Horizontal-Gelelektrophorese-System

mit 160 V und 400 mA für 45min aufgetrennt. Mittels eines UV-Schirmes mit CCD-Kamera wurde das Gel digitalisiert (Abbildung 2).

Gelelektrophorese

Abbildung 2



2.8.8 Markierungs-PCR

Das Primäramplifikat wurde als geeignet befunden, wenn die Produkte der kürzeren beiden Kontrollgene α -Catenin und Plakoglobin nachgewiesen werden konnten. Bei positivem Ergebnis der Kontroll PCR wurden 0,5 μ l des primären PCR-Produkts verwendet, um die Tumor-DNA zu amplifizieren. Dem Ansatz wurde zusätzlich Digoxigenin-11-dUTP hinzugegeben, welches während der Amplifikation in die Tumor-DNA eingebaut wird und später eine spezifische Detektion mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern ermöglicht, die gegen das Digoxigenin gerichtet sind. In einem parallelen Ansatz wurde Kontroll-DNA (isoliert aus dem Blut von Andreas Lübke) analog mit Biotin-16-dUTP markiert. Den PCR-Ansatz und das PCR-Programm geben die Tabellen 17 und 18 wieder.

Markierungs-PCR Ansatz

Tabelle 17

Expand-Long-Template Puffer 1	4,0µl
LIB1 10 µM	4,0 µl
7/8 dNTP-Mix (8,75 mM dTTP; je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)	1,4 µl
1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)	1,75 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	1,0 µl
H ₂ O	29 µl
Gesamtvolumen	41,15 µl

Markierungs-PCR Programm

Tabelle 18

Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen
94°C	1 min	30 sec
60°C	30 sec	30 sec
72°C	2 min	2 min + 20 sec pro Zyklus

2.8.9 Abtrennung des LIB1 Primers

Um Interferenzen bei der folgenden Hybridisierung zu verhindern, wurde der LIB1 Primer nach der Markierungs-PCR durch einen Restriktionsverdau mit Tru I (Isoenzym von Mse I mit der Schnittstelle T'TAA) abgetrennt (Ansatz Tabelle 19). Die Inkubation mit dem Tru I Enzym erfolgte für 23 Stunden bei 65°C.

Ansatz Abtrennung des LIB1 Primers

Tabelle 19

Produkt Markierungs-PCR	41,15µl
Tru I (50 U/µl)	2,0 µl
Puffer R	2,0 µl

2.9 Metaphasenpräparation

Für die komparative genomische Hybridisierung wurden humane Metaphasen-Chromosomen als Hybridisierungsmatrix benötigt. Diese wurden für die vorliegende Arbeit selber hergestellt. Zunächst wurde das Kulturmedium für die Metaphasen vorbereitet: Zu 250 ml RPMI-Medium1640 wurden 37,5 ml fetales Kälberserum, 5ml Penicillin-Streptomycin Lösung, 2,5ml L-Glutamin und 3ml Phytohämagglutinin hinzugegeben. Einem gesunden männlichen Spender (Andreas Lübke) wurden dann 20ml peripheres Blut abgenommen, das sofort heparinisiert wurde. Das Blut wurde in das Kulturmedium gegeben und in Zellkulturflaschen (jeweils 10ml) aufgeteilt. Es folgte eine Inkubation für 72 Stunden im Wärmeschrank. Nach 72 Stunden wurden jeder Kulturfläche 100µl Colcemid (Endkonzentration 10µg/ml) hinzugegeben und dann eine Stunde gewartet, um die Lymphozyten in der Metaphase zu arretieren. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 1500 Upm. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10ml einer 0,075 molaren Kalium-Chlorid-Lösung langsam und vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 8 Minuten bei 37°C, die die restlichen Erythrozyten zerplatzen und die Lymphozyten aufquellen ließ. Danach folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 1500 Upm. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Pellet mit einer Fixationslösung (3:1 Methanol-Eisessig-Lösung, Temperatur: -20°C) resuspendiert. Die Metaphasen waren nun in der Fixationslösung etwa ein Jahr haltbar.

Aus der Metaphasensuspension wurden dann die Metaphasenpräparate hergestellt: Mit Alkohol gereinigte Objektträger wurden kurz mit doppelt destilliertem Wasser abgespült und bei -20°C gekühlt. Die Suspension wurde in einer 100µl Pipette aufgezogen und einige Tropfen der Suspension aus etwa einem halben Meter auf gekühlte Objektträger aufgetropft. Diese Objektträger wurden dann auf befeuchteten Tüchern auf einer Heizplatte bei einer Temperatur von 40°C getrocknet. Diese Metaphasen-Objektträger waren nun bei -80°C in verschweißter Plastiktüte unbegrenzt haltbar. Vor Gebrauch wurden die Metaphasenpräparate eine Woche lang in unvergälltem 70%igen Alkohol bei 4°C gelagert.

2.10 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die markierten PCR-Produkte der Tumor-DNA und der Referenz-DNA wurden bei der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) gemeinsam auf humane Metaphasen hybridisiert. Dafür wurden beide PCR-Produkte mit Cot-1 DNA und Heringsperm DNA versetzt, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Der Ansatz wurde anschließend über Nacht mit 3 molarer Natriumacetat-Lösung in 100%igem Alkohol bei -20°C ausgefällt (Ansatz siehe Tabelle 20).

Ausfällung der CGH-Sonde

Tabelle 20

Tumor-DNA PCR-Produkt (Digoxigenin markiert)	40 µl
Referenz-DNA PCR-Produkt (Biotin markiert)	40 µl
Cot-1 DNA (1µg/µl)	75 µl
Heringsperm DNA (10 µg/µl)	10 µl
3 M NaAc pH 5,2	15 µl
100% EtOH	360 µl

Am nächsten Tag folgte ein Abzentrifugieren bei 4°C und 14.000 Upm für 45 Minuten. Der Ethanolüberstand wurde dekantiert, erneut 700 µl 70%iger Alkohol hinzugegeben, der Ansatz erneut bei 4°C und 14.000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde mit 6µl 100%igem Formamid für eine Stunde in einem Wasserbad bei 37°C aufgelöst. Anschließend wurden 6µl Mastermix (4x SSC, 30% Dextran Sulfat) hinzugegeben, die Lösung wurde für 1min gevortext und anschließend 5min bei 14.000 Upm herunterzentrifugiert. Darauf folgte die Denaturierung der Sonde für 6 Minuten in einem Heizblock bei 78°C. Danach wurde der Sondenmix für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei sättigt die Cot-1 DNA unspezifische repetitive Sequenzen von Tumor- und Referenz-DNA ab, wodurch später der Hintergrund erheblich reduziert und so die spezifischen Hybridisierungen hervorgehoben werden.

Zwischenzeitlich wurde der Metaphasen-Objektträger für die Hybridisierung vorbereitet. Die bei -80°C gelagerten Metaphasenpräparate wurden aus dem Tiefkühler genommen, auf Raumtemperatur gebracht und in 2xSSC Puffer überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit RNase-Lösung (200 µl RNase A - 100 µg/ml in 2x SSC) bei 37°C für eine Stunde, um restliche RNA zu entfernen, die durch

2. Material und Methoden

unspezifische Hybridisierung die CGH empfindlich stören kann. Die RNase wurde danach durch dreimaliges Spülen in 2xSSC Puffer bei Raumtemperatur (jeweils 5 Minuten) entfernt. Als nächstes wurden die restlichen Zytoplasmaanteile durch Inkubationen in einer Pepsin-Lösung entfernt. Dafür wurden die Metaphasen-Objektträger in eine Glasküvette mit 100ml einer 10mM Salzsäurelösung mit Zusatz von 50 µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml in H₂O) überführt und 2 bis 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Zeitfenster der Inkubation richtete sich nach dem individuellen Umfang der Zytoplasmareste. Anschließend wurde durch zweimaliges Spülen in PBS-Puffer bei Raumtemperatur (jeweils 5 Minuten) der Pepsinverdau angehalten. Danach wurde das verbleibende Chromatingerüst mit 200µl einer Paraformaldehyd-Lösung (50 mM MgCl₂ in PBS mit 1% PFA) nachfixiert. Der Metaphasen-Objektträger wurde dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70% Ethanol, 85% Ethanol, 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten) und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Für die Denaturierung wurde eine Glasküvette mit 100ml einer Formamid-Lösung (70 ml 100% Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,5) in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 70°C gebracht. Der Metaphasen-Objektträger wurde dann zwischen 1 Minute 45 Sekunden und 2 Minuten denaturiert. Dieses Zeitfenster wurde ebenfalls individualisiert auf jede einzelne Metaphase angepasst, denn die individuelle Morphologie der Metaphasen und die Auswirkungen des Pepsin-Verdaus haben erheblichen Einfluss auf die Beschaffenheit der Metaphasen für die Hybridisierung. Die Denaturierung stellt einen der empfindlichsten Schritte der gesamten komparativen genomischen Hybridisierung dar.

Nach der Denaturierung wurde der Metaphasen-Objektträger sofort in eine aufsteigende Alkoholreihe bei 4°C überführt (70% Ethanol, 85% Ethanol, 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten) und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach folgte das Aufbringen der vorbereiteten CGH-Sonde auf den Metaphasen-Objektträger. Die Sonde wurde mit einem 18x18mm Deckgläschen eingedeckelt und die Ränder mit Montagekleber (Fixogum) versiegelt.

Die Hybridisierung wurde anschließend in einer in einem Wasserbad schwimmenden feuchten Hybridisierungskammer bei 37°C für 48 bis 72 Stunden durchgeführt.

Anschließend erfolgten das vorsichtige manuelle Ablösen der Fixogum-Versiegelung und eine Inkubation für zweimal 5 Minuten in 4xSSC Puffer bei Raumtemperatur auf

2. Material und Methoden

einem Schüttler, um das Deckgläschen vorsichtig zu entfernen. Danach folgte für jeweils 5 Minuten ein dreimaliges Waschen in einer Formamid-Lösung bei 42°C (150 ml Formamid 100%, 30 ml 20x SSC, 120 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,5), um die nicht hybridisierten Sondenanteile abzuwaschen. Anschließend wurde der Metaphasen-Objektträger nochmals für 5 Minuten in 1xSSC Lösung bei 42°C gewaschen.

Es folgte eine Absättigung der Proteinbindungsstellen mit 1ml Blockierungslösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 3% BSA Fraktion V, 5% FCS) für 45 Minuten in einer feuchten Kammer. Danach wurde der Metaphasen-Objektträger mit PBS-Puffer mit 0,2% Tween Anteil zweimal für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur gespült.

Danach folgte das Aufbringen der Flourochrom-markierten Antikörper gegen Digoxigenin und Biotin (Ansatz nach Tabelle 21).

Flourochrom Antikörper Ansatz

Tabelle 21

20 µl Anti-Digoxigenin-FITC,	20 µl
2 µl Avidin-Cy 3.5	2 µl
1% Blockierungslösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 1% BSA Fraktion V, 5% FCS)	185 µl

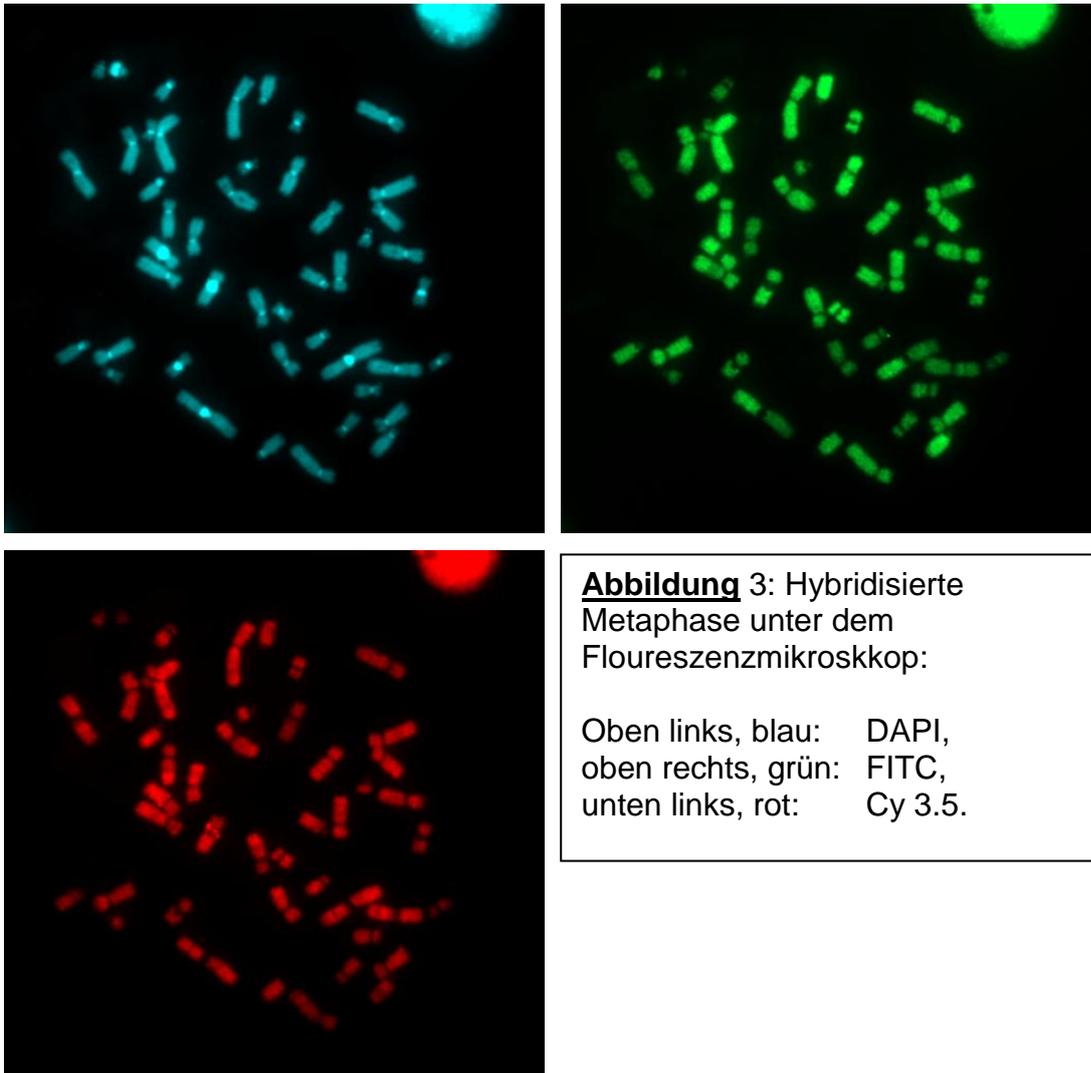
Der Ansatz wurde unter einem 24x55 mm Deckgläschen für 45 Minuten bei 37°C in einer dunklen feuchten Kammer im Wasserbad inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten bei 42°C in einer 4xSSC-Lösung mit einem 0,2% Tween-Anteil zur Entfernung der Antikörper, welche nicht an ihr Zielprotein gebunden hatten.

Abschließend erfolgte für 2 Minuten die Gegenfärbung der Chromosomen mittels einer DAPI-Lösung (1 ml 4x SSC + 0,2% Tween, 10 µg DAPI). Der Objektträger wurde dann mit destilliertem Wasser abgespült und bei Dunkelheit bei Raumtemperatur getrocknet.

Das Präparat wurde dann mit der Konservierungslösung Vectashield H-1000 unter einem 24x55 mm Deckgläschen eingedeckelt und bei Dunkelheit bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt.

2.11 CGH Auswertung

Für die CGH-Auswertung wurde ein Leica DMXA-RF8 Fluoreszenzmikroskop mit einer Sensys CCD-Kamera sowie der Leica Q-CGH Software verwendet. Es wurden von jedem Fall digitale Bilderserien von 8 bis 12 Metaphasen aufgenommen, jeweils in den Filtern DAPI (DNA-Gegenfärbung), FITC (Tumor-DNA) und Cy 3.5 (Referenz-DNA) (Abbildung 3).



2. Material und Methoden

Danach wurden die Chromosomen anhand ihrer charakteristischen Bänderung manuell in Karyogramme sortiert (Abbildung 4).



Abbildung 4: Konversion des DAPI-Bildes in schwarz/weiß. Die charakteristische Bänderung der Chromosomen in der DAPI-Färbung erlaubt die Sortierung der einzelnen Chromosomen. Man erkennt beispielsweise das Chromosom 6 an seiner charakteristischen dunklen Bande am distalen p-Arm mit einer weiter proximal gelegenen Aufhellung, welches zusammen an einen „Husarenhut“ erinnert (*). Das Chromosom 10 erkennt man an seiner direkt unterhalb der Zentromerregion auf dem p-Arm gelegenen Aufhellung (<).

Mit der Leica Q-CGH Software konnte dann die Signalintensität der Tumor-DNA im Verhältnis zur Referenz-DNA berechnet werden. So entstand für jedes Chromosom ein CGH-Profil, das DNA-Gewinne und Verluste mit einer Auflösung von etwa 10 Megabasen darstellen konnte. Bei einem Fluoreszenzintensitätsverhältnis zwischen

der Tumor-DNA und der Referenz-DNA von größer als 1,25 bzw. kleiner als 0,75 lag ein Gewinn bzw. Verlust in der jeweiligen chromosomalen Region vor.

2.12 Statistische Berechnungen

Die statistische Datenanalyse wurde mit der SPSS Software 12.0 und der R Software durchgeführt. Für die Analyse der CGH-Aberrationen und der Chromosomen-Ideogramme wurde das Progenetix-Format verwendet. Für die Berechnung der Zusammenhänge von nicht-parametrischen Daten (Anzahl an chromosomalen Aberrationen, Anzahl an chromosomalen Zugewinnen, Anzahl an chromosomalen Verlusten) und klinisch-pathologischen Variablen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Um die Assoziation zwischen genomischen Veränderungen untereinander sowie die Assoziation zwischen genetischen Veränderungen und klinisch-pathologischen Parametern zu untersuchen, wurde der exakte Test nach Fisher und - wenn möglich - der Chi-Quadrat Test angewandt. Das tumorspezifische Überleben wurde mittels der Kaplan-Meier Analyse ermittelt. Unterschiede in der Überlebenszeit in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Variablen (z.B. Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Tumorgrading) und den chromosomalen Aberrationen wurden mittels des log-rank Testes untersucht. Das Gesamtüberleben wurde berechnet als die Zeitspanne zwischen Operationszeitpunkt und dem Todeszeitpunkt bzw. dem Zeitpunkt der letzten klinischen Nachbeobachtungsdaten. Das krankheitsfreie Überleben wurde definiert als die Zeitspanne zwischen der Operation und dem Zeitpunkt des Rezidivs bzw. dem Zeitpunkt der letzten klinischen Nachbeobachtungsdaten bzw. des Todeszeitpunkts. Die Patienten ohne Rezidiv zum Zeitpunkt der letzten Nachbeobachtung wurden zensiert, um zu diesem Zeitpunkt eine Studienaussage machen zu können. Für die multivariate Datenanalyse wurde das proportionale Hazardmodell nach Cox angewendet. Bei einem p-Wert von $<0,05$ wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen als signifikant gewertet.

2.13 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Geräte, Oligonukleotide, Primer, Verbrauchsmaterialien, Zelllinien, Puffer

Antikörper

Anti-Digoxigenin-Flourescein	Roche, Mannheim
Avidin-Cy3.5	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Biotin-SP-conjugated Goat-anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA
Hercep-Test®	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
mouse anti-Digoxigenin	Roche, Mannheim, Germany
normal rabbit immunoglobis G fraction	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
peroxidase-conjugated streptavidin	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.

Chemikalien

Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess. Oldendorf
ATP	Roche, Mannheim
Silan	Merck, Darmstadt
BSA für PCR	Roche, Mannheim
BSA Fraktion V	Paesel und Lorei, Hanau
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Dextran Sulfat	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-11-dUTP stabil	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
FCS	PAA Laboratories, Cölbe

2. Material und Methoden

Formamid	Merck, Darmstadt
Goat-Serum 10% in PBS	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma, Deisenhofen
Hering Sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Human Cot-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Hybrisol VI	Oncor, Gaithersburg, MD
Hybridisierungsbehälter:	
Frischhaltedose 20x20x6,5cm	Gerda GmbH & Co. Schwelm
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
metal-enhanced diaminobenzidine	Pierce, Rockford, IL
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NP 40 (PathVysion™ HER2 DNA Probe Kit)	Vysis Inc, Downers Grove, IL
OPA Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Orange G	Sigma, Deisenhofen
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phytohämagglutinin M	Merck, Darmstadt
RPMI ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Linearis, Hamburg
Xylol	Roth, Karlsruhe
1kb DNA ladder	Roche, Mannheim

Enzyme

DNA-Polymerase I (E. coli)	New England Biolabs, Frankfurt
Expand Long Template DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Mse I 50 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin für FISH und CISH	Sigma, Deisenhofen
Pepsin für CGH	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000
CCD-Kamera (Agarose-Gel)	INTA
CCD-Kamera (CGH)	Photometrix
Durchlichtmikroskop (histologische Fotos)	Zeiss Scope.A1
Digitalkamera (histologische Fotos)	Zeiss AxioCam MRc
Digitalkamera (makroskopische und histologische Fotos)	Canon Powershot G2
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer
Horizontal Gelelektrophorese	Invitrogen
Invertmikroskop	Leica DM IRB
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried
Mikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf
MJR PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Thermoprinter	Sony
Wasserbad	Lauda MT2

Oligonukleotide und Primer

LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11	TAA CTG ACA G-dideoxy C
p53 exon2/3-5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 exon2/3-3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
CK 19-5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
CK 19-3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
α -catenin-5'	CAC CTA TTC GAC CTA ATG AC
α -catenin-3'	TGA AGT CCT CTC CAA CGT G
Plakoglobin-5'	CAG TTA GCC AAG ATA ATG CC
Plakoglobin-3'	CTC ATA AGG GGA TAA AGG AC

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion, München, HPLC gereinigt synthetisiert.

Sonden

Digoxigenin-labeled centromeric probe for chromosome 7	Oncor, Gaithersburg, MD
Digoxigenin-labeled centromeric probe for chromosome 8	Oncor, Gaithersburg, MD
Digoxigenin-labeled centromeric probe for chromosome 17	Oncor, Gaithersburg, MD
Digoxigenin-labeled HER2 probe PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	Zymed Inc, San Francisco, CA Vysis Inc, Downers Grove, IL

Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Marienfeld
Falconröhrchen 15ml und 50ml	Sarsted
Glas-Küvetten	Roth
Zellkulturflächen	Sarstedt
Objektträger	Marienfeld
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Polyethylenmembran	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf

3. Ergebnisse

3.1 Vergleichende Analyse von FISH und CISH

Das Mittel der Wahl zur Detektion einer HER2-Genamplifikation ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter der simultanen Verwendung unterschiedlich farbmarkierter Sonden für Chromosom 17 und HER2, um eine echte HER2-Amplifikation von einer Polysomie von Chromosom 17 zu unterscheiden (Abb. 1).

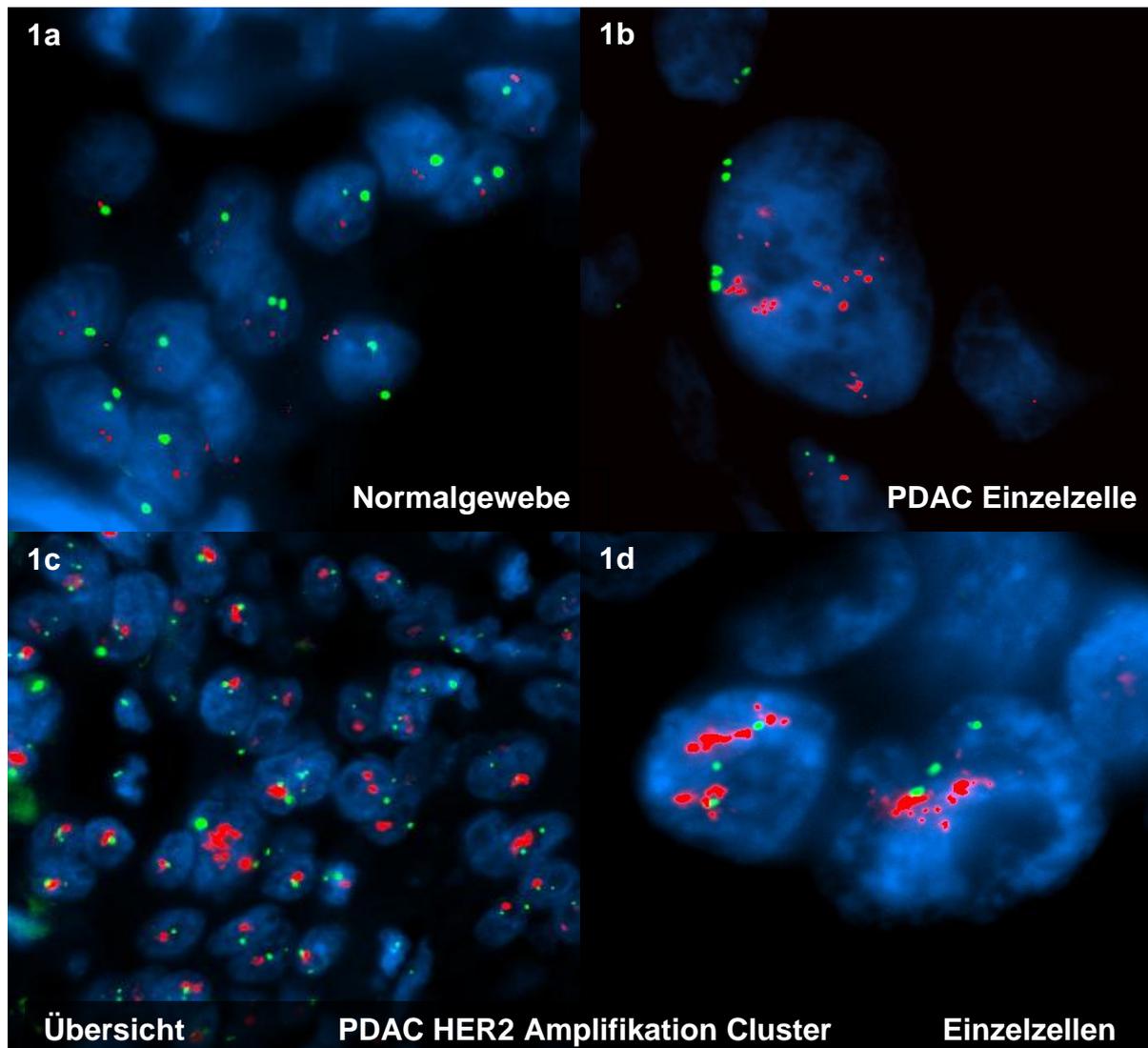


Abbildung 1: Farblegende: Chromosom 17: grün markiert, HER2: rot markiert, Kerngegenfärbung: blau. 1a: Normalgewebe mit Drüsenazini. Jede Zelle zeigt 1-2 Hybridisierungssignale für Chromosom 17 und HER2. 1b: Tumorzelle eines duktales Pankreasadenokarzinoms mit 4 Kopien von Chromosom 17 und teils clusterförmiger HER2-Amplifikation. 1c: Duktales Pankreasadenokarzinom in der Übersichtsvergrößerung mit ausgeprägten clusterförmigen Genamplifikationen für HER2. 1d: Einzelzellen clusterförmiger HER2-Amplifikation.

3. Ergebnisse

Bedingt durch die schwierige Morphologie der meisten duktaalen Pankreasadenokarzinome ist die histologische Unterscheidung zwischen Tumorzellen und dem Normalgewebe im Fluoreszenzbild oftmals unmöglich. Um dieses Problem alternativ zu lösen, wurde die Chromogen-in-situ-Hybridisierung (CISH) verwendet, die neben den exakten Hybridisierungssignalen auch eine exzellente Morphologie bietet. Da die CISH-Methode nur einen Farbstoff verwendet und somit nur eine Sonde pro Präparat hybridisiert werden kann, wurden für die Hybridisierung von Chromosom 17 und HER2 zwei konsekutiv geschnittene Präparate verwendet.

Um diese Methode zu validieren, führten wurden bei einem Kollektiv von 6 Patienten sowohl die FISH als auch die CISH durchgeführt. Die Tumorzellen dieser Karzinome waren in der FISH eindeutig zu identifizieren und die Hybridisierungen wurden sowohl an Normal- als auch an Tumorgewebe durchgeführt. Alle Ergebnisse der CISH konnten mit der FISH bestätigt werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 1. Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der FISH und der CISH ($p < 0.05$).

Validation FISH / CISH

Tabelle 1

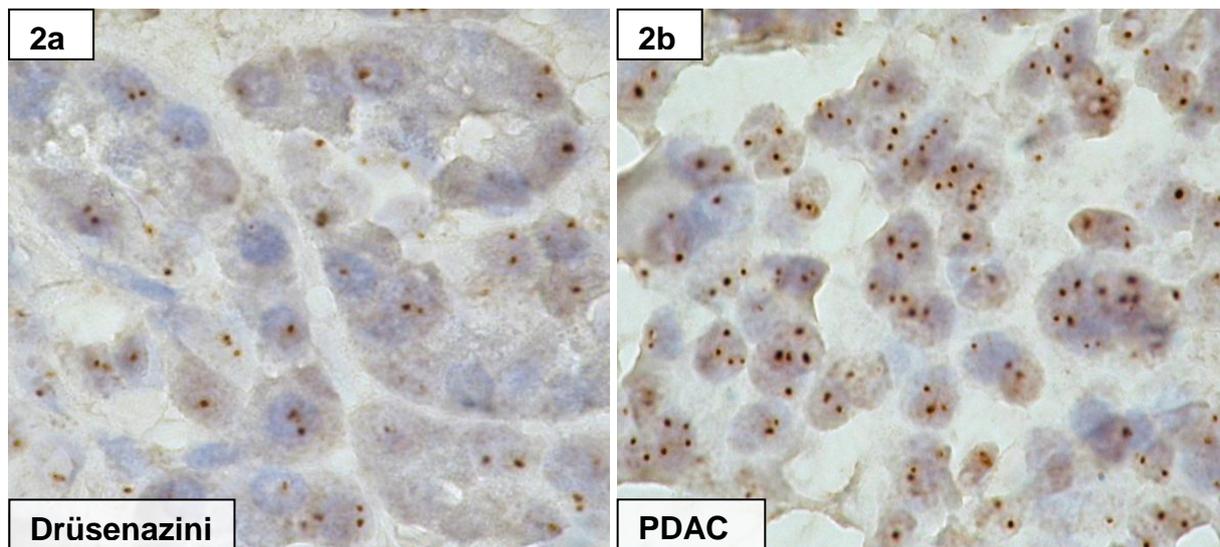
Probennummer	2102		2058		1277		2568		2555		2056	
Methode	CISH	FISH	CISH	FISH	CISH	FISH	CISH	FISH	CISH	FISH	CISH	FISH
CI Chromosom 17	1,90	1,80	1,91	1,81	3,46	4,30	3,19	3,57	2,70	2,90	2,10	1,90
CNI HER2	1,90	1,86	2,04	1,79	7,66	12,10	7,77	7,81	18,80	19,10	19,70	18,30
HER2/ Chromosom 17	1,10	1,03	1,07	0,99	2,21	2,81	2,44	2,19	6,59	7,07	8,90	8,74

3.2 Kopienzahl von Chromosom 17 (CISH)

Zunächst erfolgte die Zählung der CISH-Signale von Chromosom 17 bei 200 Zellkernen in normalen exokrinen Drüsenzazini des Pankreas, um eine Normalkontrolle zu generieren (Abb. 2a).

Chromosom 17 CISH

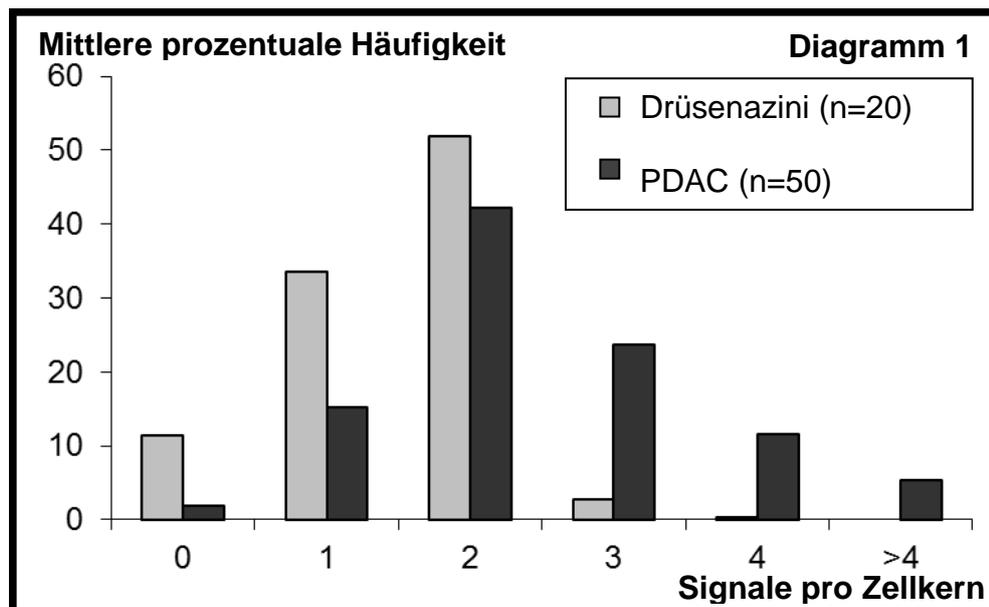
Abbildung 2



Der durchschnittliche chromosomale Index (CI), die Anzahl an Signalen für Chromosom 17, belief sich im Normalgewebe bei $1,48 \pm 0,10$ - mit einer Spannweite von 1,29-1,68. Die normalen Azinuszellen wurden folglich als normal und disom klassifiziert. Im Gegensatz dazu betrug der durchschnittliche chromosomale Index in den duktalem Pankreasadenokarzinomen $2,54 \pm 0,62$ - mit einer Spannweite von 1,65 - 4,26. Im Vergleich zum Normalgewebe war der mittlere chromosomale Index (CI) für Chromosom 17 aller untersuchten PDACs signifikant erhöht ($p < 0,001$). Eine Übersicht der Signalverteilungen im Normalgewebe und in den duktalem Pankreasadenokarzinomen gibt Diagramm 1.

Anhand der Ploidie von Chromosom 17 konnten die Tumore ($n=50$) in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, eine disome ($n=19$), eine trisome ($n=19$) und eine hypertetrasome Gruppe ($n=12$) (Tabelle 2).

Kopienzahl Chromosom 17 pro Zellkern: Normalgewebe vs. PDAC



Signalverteilung duktale Pankreasadenokarzinome Tabelle 2

Chromosom 17 Ploidie aller PDACs	Anzahl (%)
Monosom	0
Disom	19 (38)
Trisom	19 (38)
Tetrasom	0
Hypertetrasom	12 (24)

Der Grad der Aneuploidie zeigte keine Korrelation zum T-Stadium, N-Stadium oder dem Differenzierungsgrad (G-Status) der Tumore.

3.3 Überprüfung der Tumorploidie durch Untersuchung mittels weiterer Zentromersonden

Um zu bestimmen, ob die vermehrte Kopienzahl von Chromosom 17 ein spezifisches Merkmal einiger duktaler Adenokarzinome des Pankreas ist oder als allgemeiner Parameter für die Ploidie gewertet werden konnte, wurden von allen Tumoren, die disom für Chromosom 17 waren (n=19), an konsekutiven Schnittpräparaten zusätzlich Hybridisierungen für die Zentromere von Chromosom 7 und 8 durchgeführt. Chromosom 7 und Chromosom 8 gehören beim duktalem Pankreasadenokarzinom zu den am häufigsten alterierten Chromosomen

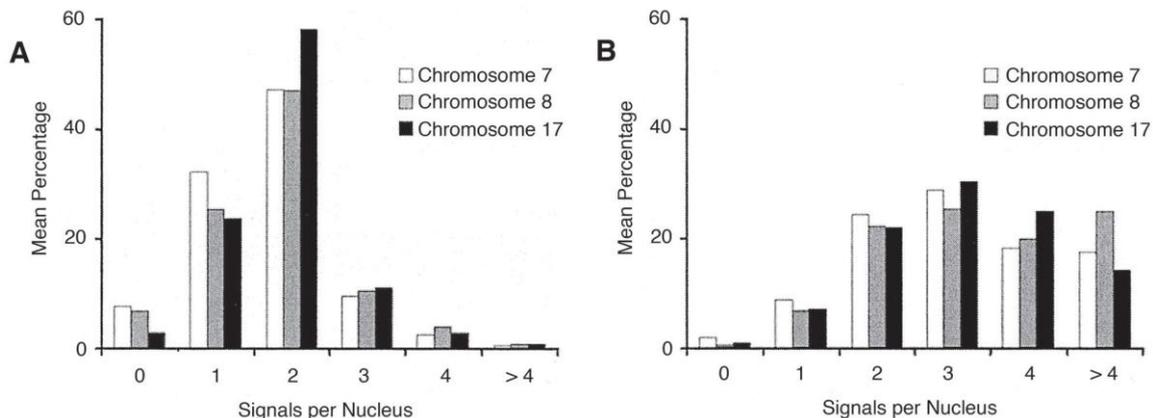
3. Ergebnisse

[Malhamaki 1997, Harada 2002]. Daher wäre zu erwarten gewesen, dass Tumore, welche eine Disomie für Chromosom 17 zeigen, ebenfalls disom für Chromosom 7 und 8 sind. Von allen neunzehn Tumoren, die sich als disom für Chromosom 17 präsentierten, waren nur zwei nicht disom für Chromosom 7 und Chromosom 8. Der mittlere chromosomale Index (CI) betrug für Chromosom 7 $1,69 \pm 0,29$ und für Chromosom 8 $1,80 \pm 0,34$ und ähnelte somit dem CI für Chromosom 17 (Diagramm 2a).

Zusätzlich wurden jeweils fünf zufällig ausgewählte Tumore aus der trisomen und der hypertetrasomen Gruppe für Chromosom 7 und 8 hybridisiert, welche die Aneuploidie bestätigten (Diagramm 2b).

2a: Disome Tumore

2b: Trisome und hypertetrasome Tumore



Aus Stoecklein et al. 2004

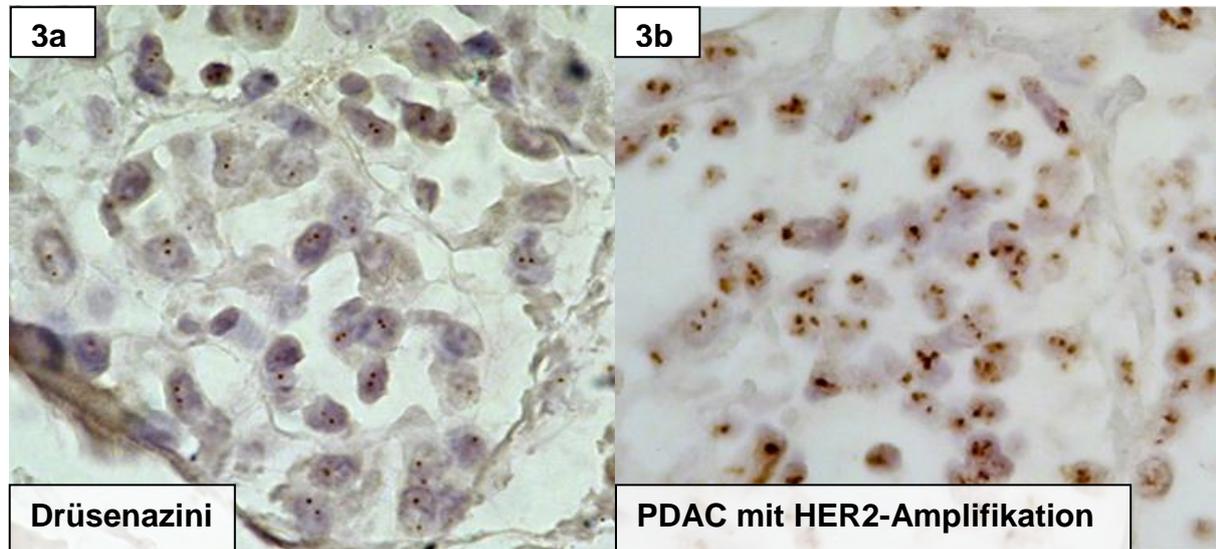
Zusammenfassend bestätigten die zusätzlichen Hybridisierungen von Zentromersonden für die Chromosomen 7 und 8 die Ploidieeinordnung, die zuvor mittels des Chromosom 17 Status erhoben wurde. Somit stellte der Chromosom 17-Status einen validen Parameter für die Ploidieeinordnung der duktaalen Pankreasadenokarzinome dar.

3.4 HER2-Amplifikation beim duktalem Pankreasadenomkarzinom

Anschließend folgte die Auszählung der Hybridisierungssignale der HER2 Region auf Chromosom 17 im Normalgewebe (Abbildung 3a) und im Tumorgewebe (Abb. 3b).

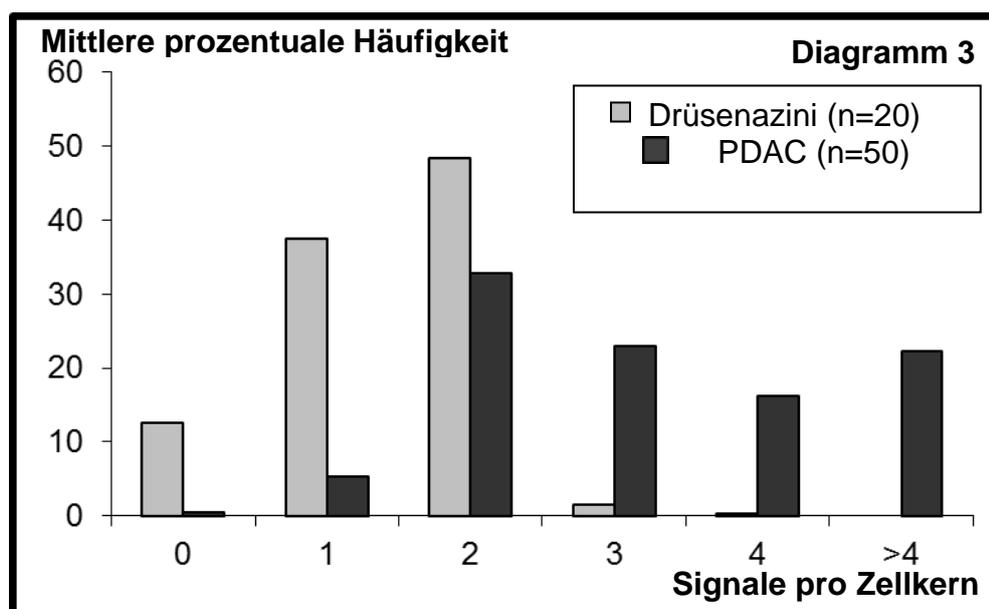
HER2 CISH

Abbildung 3



Der Mittelwert des CI der Tumorproben war gegenüber dem Normalgewebe der pankreatischen Drüsenzazini signifikant erhöht (4.11 ± 3.57 ; Spannweite: 2.04 - 18.8 gegenüber 1.39 ± 0.91 ; Spannweite: 1.21-1.55; $p < 0,001$). Eine Übersicht der Signalverteilung im Normalgewebe gegenüber dem Tumor gibt Diagramm 3.

Kopienzahl HER2 pro Zellkern: Normalgewebe vs. PDAC



3. Ergebnisse

Die HER2-Amplifikationen waren unabhängig von der Kopienzahl von Chromosom 17 und es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Größen. Ferner zeigte die Amplifikation des HER2-Locus keinen Zusammenhang mit dem Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad (Tabelle 1).

Ein Überexpression des HER2 Proteins zeigten 5 der 50 Patienten (10%). Eine starke Überexpression (Hercep-Test Score 3+) wiesen nur die Tumore mit einer high-level Amplifikation des HER2-Genlocus auf (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 HER2-Amplifikation/ p185^{HER2}-Überexpression	HercepTest							
	0		1+		2+		3+	
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
HercepTest Ergebnis (n=50)	33	66	12	24	3	6	2	4
CISH Ergebnis								
Keine HER2 Amplifikation (n=38)	26	68	10	27	2	5	0	0
low-level HER2 Amplifikation (n=10)	6	60	3	30	1	10	0	0
high-level HER2 Amplifikation (n=2)	0		0		0		2	

3.5 p185^{HER2}-Expression beim duktalem Pankreasadenokarzinom

Ein Überexpression von p185^{HER2} zeigten 5 der 50 Patienten (10%). Eine starke Überexpression von p185^{HER2} (Hercep-Test Score 3+) wiesen nur die Tumore mit einer high-level Amplifikation des HER2-Genlocus auf (Table 4).

HER2-Amplifikation / p185^{HER2}-Überexpression**Tabelle 4**

HER2	Proteinexpression	0	1+	2+	3+
Patienten	50 (100%)	33	12	3	2
Keine Amplifikation	38 (76%)	27	9	2	0
low-level Amplifikation	10 (20%)	6	3	1	0
high-level Amplifikation	2 (4%)	0	0	0	2
Keine Proteinüberexpression		45 (90%)			
Proteinüberexpression					5 (10%)

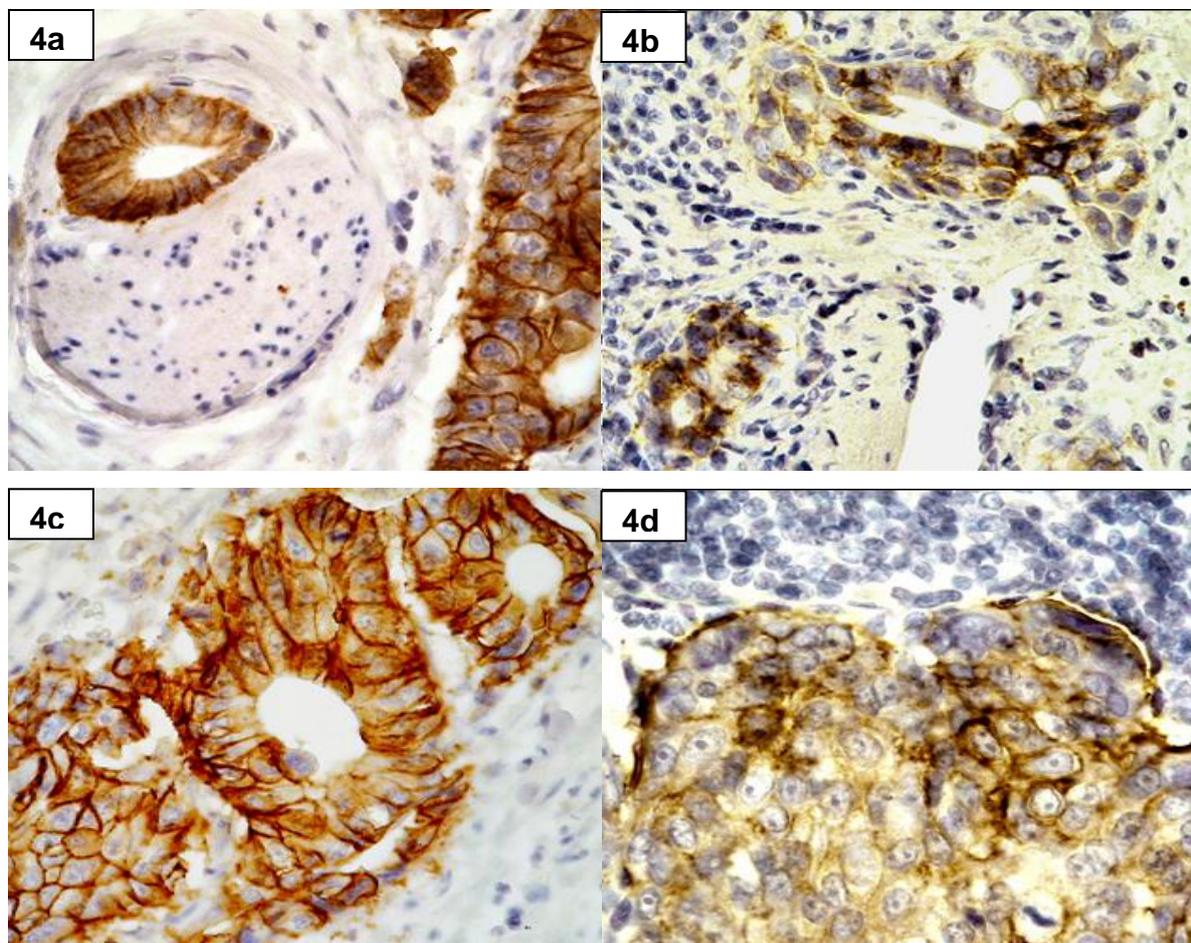
Eine zusammenfassende Übersicht des gesamten Patientenkollektivs mit Chromosom 17-Status, HER2-Genstatus und p185^{HER2}-Expression gibt Tabelle 5:

Tabelle 5			Chromosom 17									
			2		3		>4		HER2 +		p185 +	
Variable	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
Patienten	50		19	38	19	38	12	24	12	24	5	10
Männl.	28	56	12	63	10	53	6	50	6	50	3	60
Weibl.	22	44	7	37	9	47	6	50	6	50	2	40
Primärtumor												
pT1	3	6	1	6	1	6	1	9	-	-	-	-
pT2	25	50	9	47	9	47	7	58	9	75	2	40
pT3	22	44	9	47	9	47	4	33	3	25	3	60
Lymphknoten												
pN0	25	50	13	68	7	37	5	42	6	50	1	20
pN1	25	50	6	32	12	63	7	58	6	50	4	80
Grading												
G2	26	52	12	63	8	42	6	50	6	50	2	40
G3	24	48	7	37	11	58	6	50	6	50	3	60
Legende:												
2=disom, 3=trisom, 4=hypertetrasom												
HER2 + = HER2-Genamplifikation												
p185 + = Proteinüberexpression												

3.6 p185^{HER2}-Überexpression in Lymphknotenmetastasen bei high-level Amplifikation

Zwei Patienten des Kollektivs zeigten eine Überexpression von p185^{HER2} bei high-level Amplifikation der HER2-Genregion. Beide Patienten wiesen ebenfalls Lymphknotenmetastasen auf. Zusätzlich wurde an diesen Lymphknotenmetastasen die Expression von p185^{HER2} mittels des Hercep-Tests untersucht. In beiden Fällen konnte eine p185^{HER2}-Überexpression auch in der Lymphknotenmetastase nachgewiesen werden.

p185^{HER2}-Überexpression Primärtumor / Lymphknotenmetastase **Abb. 4**



4a: p185^{HER2}-Überexpression im Primärtumor mit perineuralem Tumorwachstum.

4b: Koorespondierende Lymphknotenmetastase mit p185^{HER2}-Überexpression.

4c: p185^{HER2}-Überexpression im Primärtumor mit kribriformem Tumorwachstum.

4d: Koorespondierende Lymphknotenmetastase mit p185^{HER2}-Überexpression und prominenten Nucleolen der Tumorzellen.

3.7 Einfluß der Chromosom 17 Aneuploidie, der HER2-Amplifikation und der p185^{HER2}-Überexpression auf das Überleben

Der prognostische Effekt der HER2 Amplifikation, der p185^{HER2}-Überexpression und der Ploidie der Tumoren, gemessen an der Kopienanzahl für Chromosom 17, wurde mit der Kaplan-Meier Analyse überprüft.

Obwohl die HER2-Amplifikation (Diagramm 4a) und die p185^{HER2}-Überexpression (Diagramm 4b) keinen Einfluss auf das Überleben hatten, zeigten sich zwischen den Ploidiegruppen statistisch signifikante Unterschiede im rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben der Patienten mit disomen, trisomen und tetrasomen Tumoren (Diagramm 5).

**Kaplan-Meier Überlebenskurve
HER2-Amplifikation (4a)**

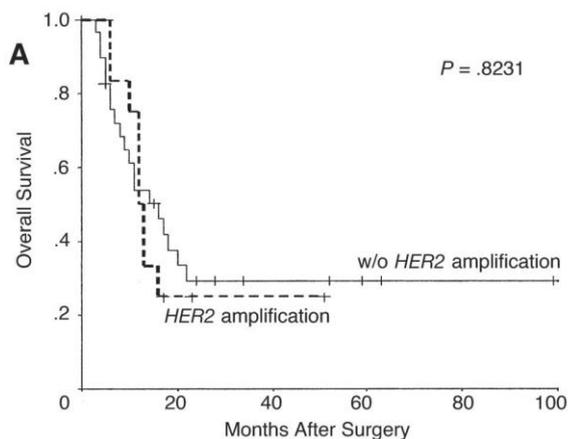
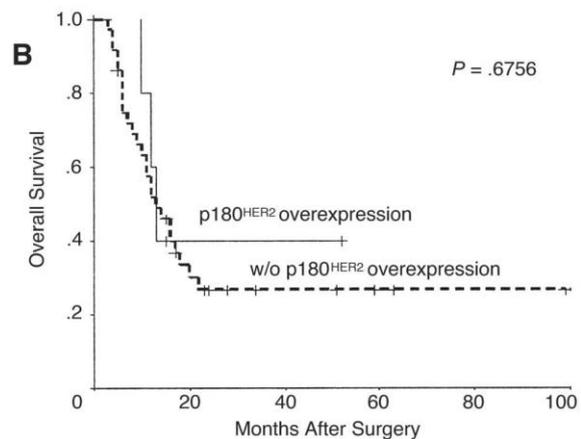


Diagramm 4

p185^{HER2}-Überexpression (4b)



Aus Stoecklein et al. 2004

Kaplan-Meier Überlebenskurve Ploidiegruppen Rezidivfreies Überleben (5a)

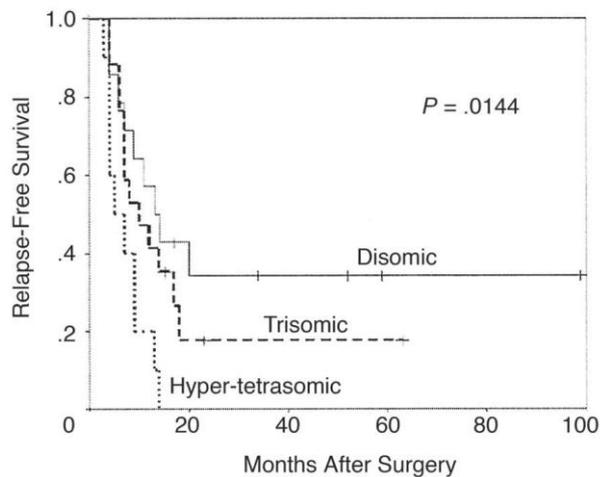
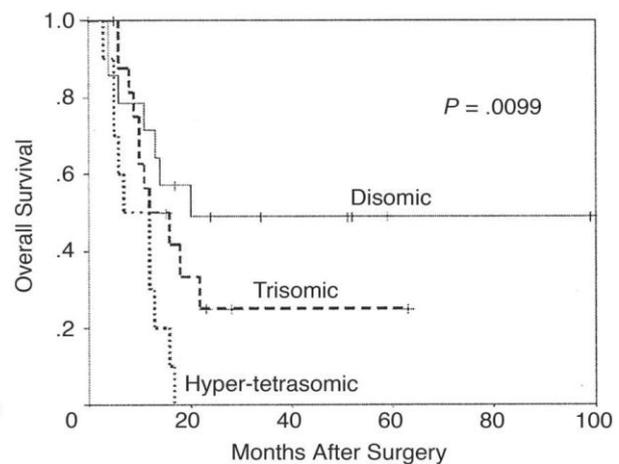


Diagramm 5 Gesamtüberleben (5b)



Aus Stoecklein et al. 2004

Die Patienten mit Hypertetrasomie für Chromosom 17 zeigten ein signifikant reduziertes rezidivfreies Überleben (Median: 5 Monate), gegenüber Patienten mit Trisomie für Chromosom 17 (Median: 10 Monate) und gegenüber Patienten mit Disomie für Chromosom 17 (13 Monate; $p=0,0144$) (Diagramm 5a).

Der gleiche Effekt der Ploidie zeigte sich im medianen kumulativen Gesamtüberleben: Hypertetrasome Tumoren 7 Monate, trisome Tumoren 12 Monate und disome Tumoren 20 Monate ($p=0,0099$) (Diagramm 5b).

In der Cox-Regression mit den Variablen Chromosom 17 Aneuploidie, Geschlecht, Alter, Nodalstatus, Primärtumorstadium und Differenzierungsgrad wurde das Akaike Informationskriterium (AIC) angewendet. Das AIC für das erste Modell für das rezidivfreie Überleben betrug 198,01 und für das finale Modell 194,94. Dieses spiegelt einen grenzwertigen unabhängigen prognostischen Einfluss der Hypertetrasomie für Chromosom 17 auf das rezidivfreie Überleben wieder. Für das Gesamtüberleben betrug das AIC des ersten Modells 172,61 und das AIC des finalen Modells 167,88. Somit war die Aneuploidie für Chromosom 17 ein signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (Tabelle 4).

3. Ergebnisse

Multivariate Cox-Regression			Tabelle 4
Variable	Relatives Todesrisiko	95% Kofidenzintervall	p
Tumorfrees Überleben			
Lymphknotenmetastasen ja / nein	2,074	0,964 – 4,460	0,062
Chromosom 17			
Hypertetrasom vs. disom	2,552	0,436 – 5,434	0,068
Hypertetrasom vs. trisom	2,289	0,935 – 6,993	0,061
Geschlecht weibl. vs. männlich	2,342	1,073 – 5,110	0,033
Grading G3 vs. G2	1,943	0,932 – 4,082	0,079
Gesamtüberleben			
Lymphknotenmetastasen ja / nein	3,627	1,519 – 8,663	0,003
Chromosom 17			
Hypertetrasom vs. disom	3,381	1,154 – 9,434	0,020
Hypertetrasom vs. trisom	2,375	0,982 – 5,747	0,055
Geschlecht weibl. vs. männlich	2,323	1,039 – 5,195	0,040

3.8 Hybridisierungsbilder und Summenkaryogramme

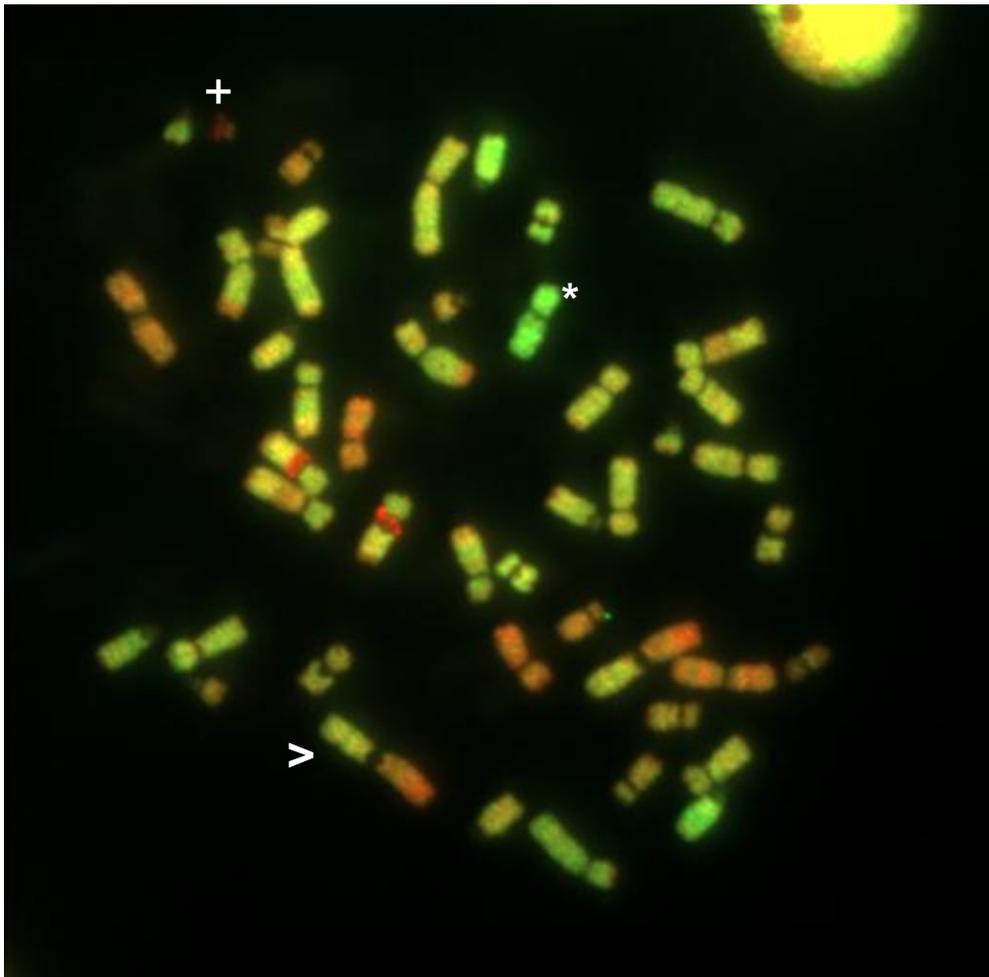


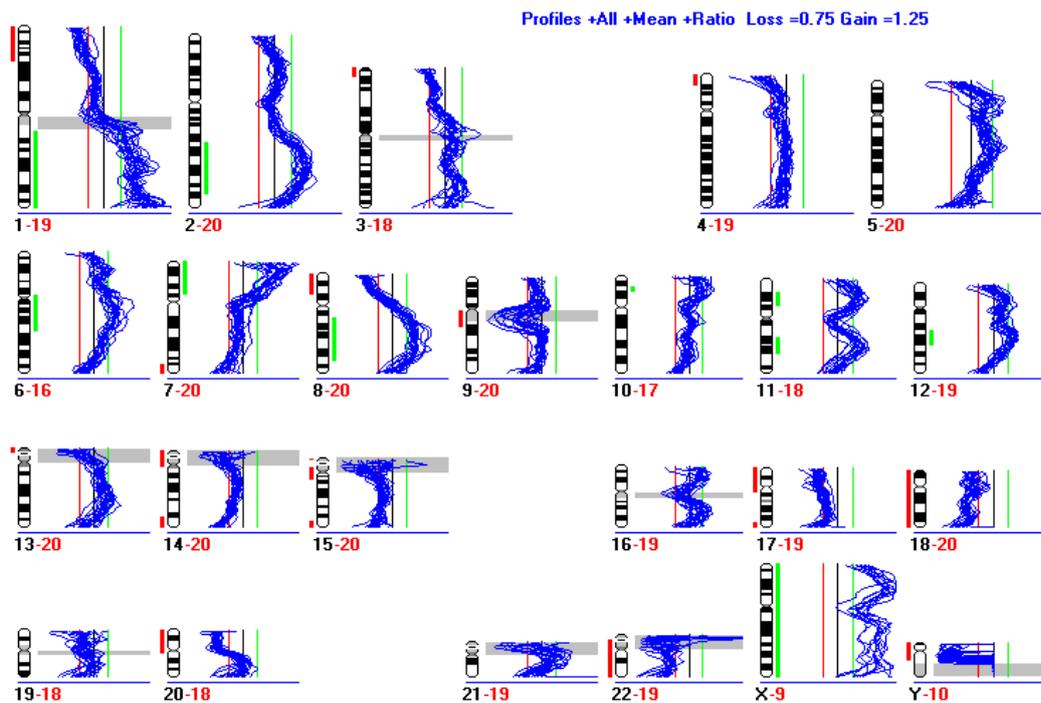
Abbildung 5: Metaphasenpräparat nach vollendeter Hybridisierung mit Normal-DNA (rot) und Tumor-DNA (grün). Rechts oben ist ein noch erhaltener Zellkern zu erkennen. Nach separater Aufnahme des Signals für die Tumor-DNA im FITC-Filter und die Normal-DNA im Cy 3.5 Filter wurden beide Bilder übereinandergelegt. Auch ohne Kerngegenfärbung mit DAPI kann man die einzelnen Chromosomen anhand ihrer charakteristischen Morphologie erkennen. Zum Beispiel ist das Chromosom 1 (>) leicht als das größte Chromosom mit gleicher Länge des p- und des q-Arms zu identifizieren und es fällt auf, dass auf dem gesamten p-Arm eine vermehrte Signalintensität für die Tumor-DNA (grün) sichtbar wird, bei gleichzeitig verminderter Signalintensität auf dem distalen Anteilen des q-Arms. Außerdem zeigt das X-Chromosom (*) eine etwa doppelt so starke Signalintensität für die Tumor-DNA, auf das Y-Chromosom (+) hybridisierte nur die (männliche) Referenz-DNA. Hieraus lässt sich auch ohne Kenntnis des Geschlechts des Patienten ableiten, dass es sich um die Tumorprobe einer weiblichen Patientin handelte.

3. Ergebnisse

Nach Sortierung der Chromosomen in Karyogramme erfolgte die digitale Erstellung der CGH-Profile, aus denen die genomischen Aberrationen abgelesen werden konnten. Von jeder Probe wurden 8 bis 12 Karyogramme verwendet und ein Summenkaryogramm erstellt (Abb. 6a und 6b).

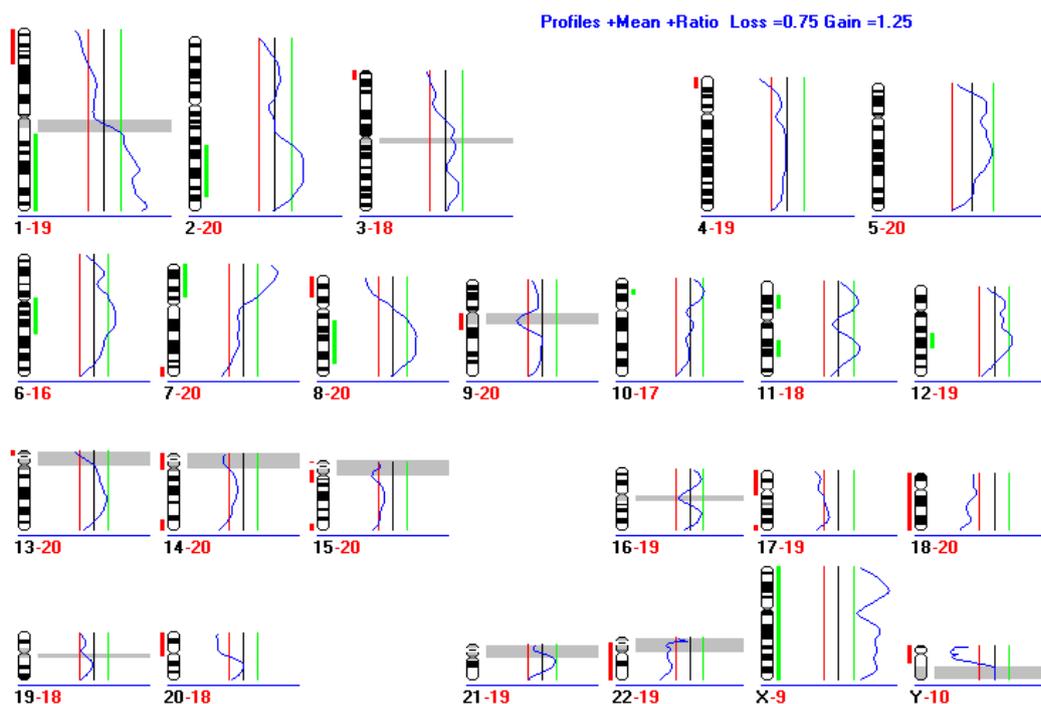
Übereinandergelegte Karyogramme eines Tumors

Abbildung 6a



Korrespondierendes Summenkaryogramm

Abbildung 6b



CGH-Summenkaryogramm eines diploiden PDACs

Abbildung 7

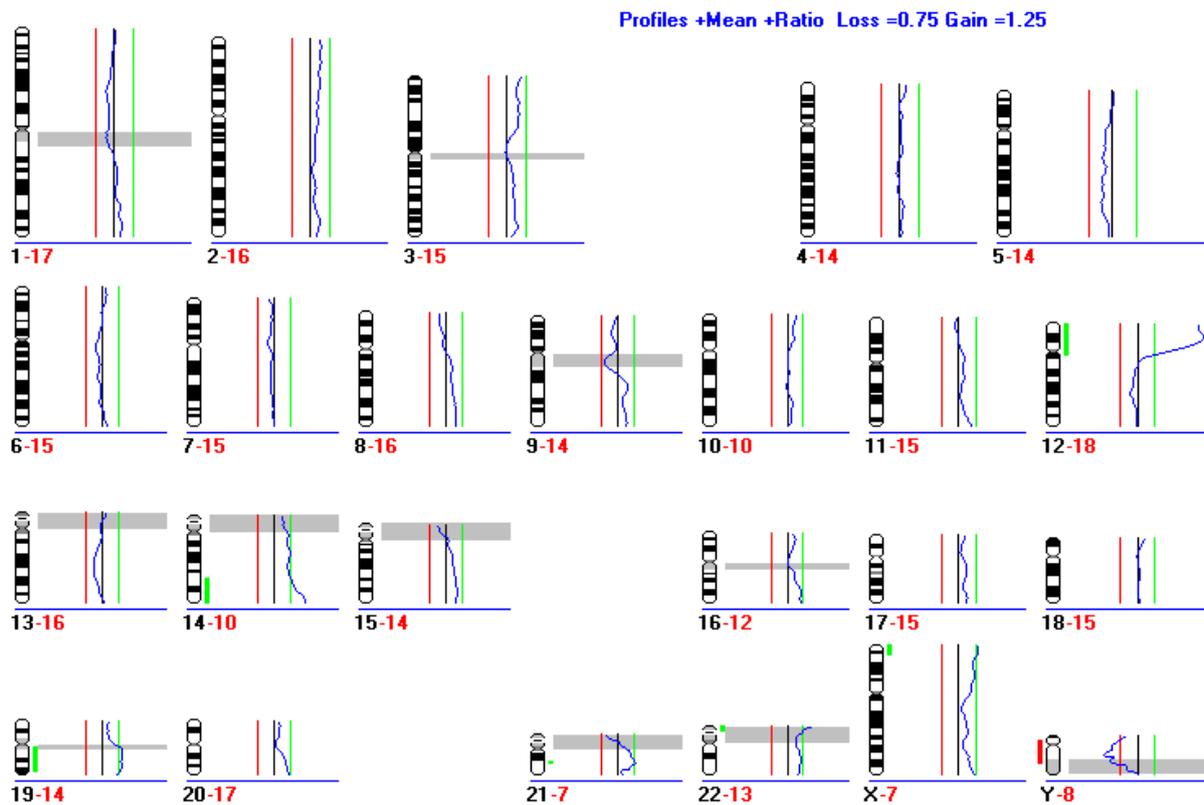


Abbildung 7: Das Summenkaryogramm zeigt ein duktales Pankreasadenokarzinom mit diploidem Chromosomensatz. Die einzigen signifikanten Amplifikationen befinden sich auf dem p-Arm von Chromosom 12 und dem distalen q-Arm von Chromosom 14. Die Aberrationen auf Chromosom 19 sowie den Gonosomen X und Y wurden generell nicht in den Datensatz eingespeist. Die grauen Areale weisen die α -Satellitenregionen aus, welche hochrepetitive Sequenzen enthalten und prinzipiell anfällig für Hybridisierungsartefakte sind.

CGH-Summenkaryogramm eines hypertetraploiden PDACs

Abbildung 8

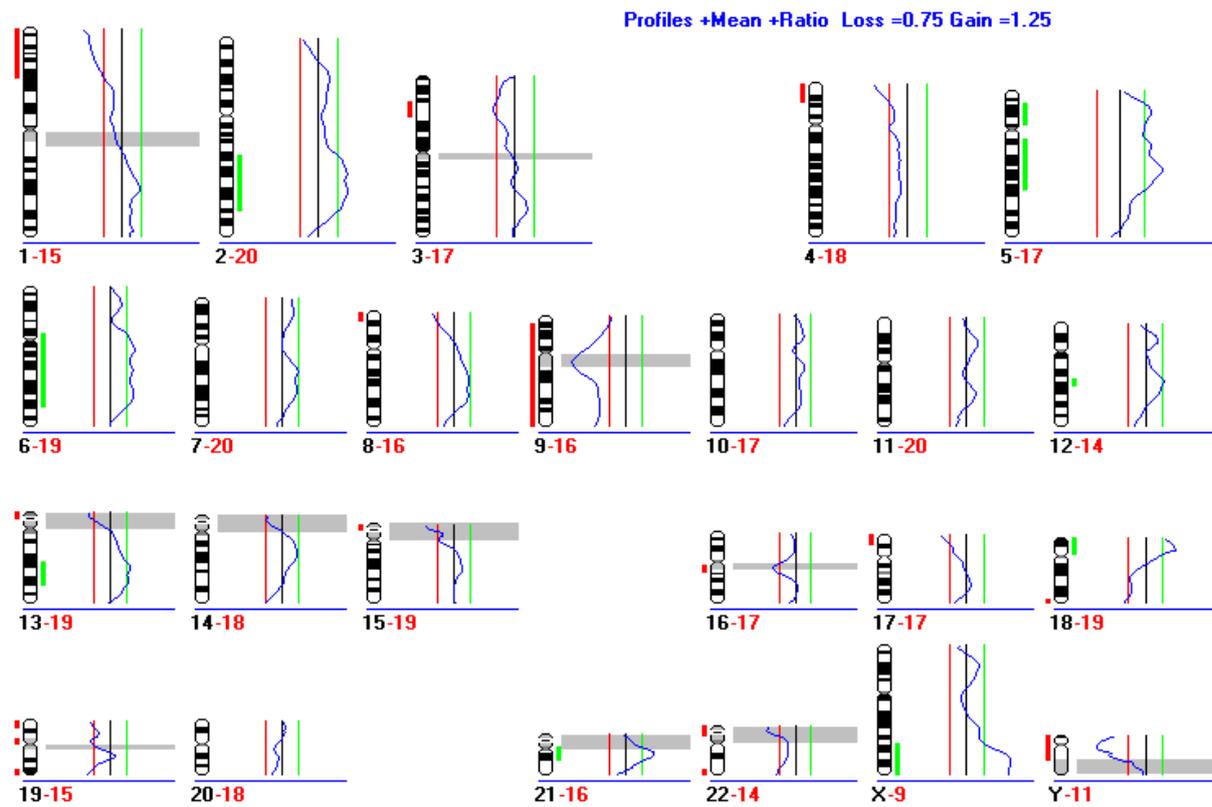


Abbildung 8: Das Summenkaryogramm zeigt ein duktales Pankreasadenokarzinom mit hypertetraploidem Chromosomensatz und zahlreichen Aberrationen, wie z.B. Verluste auf dem distalen p-Arm von Chromosom 1 und Gewinne auf dem q-Arm von Chromosom 6 und dem p-Arm von Chromosom 12. Das Chromosom 9 zeigt für die Tumor-DNA kein Hybridisierungssignal und fehlt somit im Chromosomensatz des Tumors.

3.9 CGH Ergebnisse

Die mittlere Aberrationshäufigkeit aller 52 Patienten betrug 12,2 (Standardabweichung +/- 4,9; Spannweite 3 – 22). Jeder Tumor zeigte im Durchschnitt 5,8 chromosomale Gewinne (Standardabweichung 3,5; Spannweite 1 – 16). Am häufigsten waren chromosomale Gewinne bei 2q (41%) und 8q (41%) lokalisiert. Die mittlere Häufigkeit chromosomaler Verluste betrug im beobachteten Kollektiv 6,4 (Standardabweichung 2,8, Spannweite 1-16). Die häufigsten Verluste waren auf Chromosom 17 (65%) lokalisiert. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl an chromosomalen Gewinnen und der der Anzahl an chromosomalen Verlusten (Mann-Whitney Test, $p=0,34$). Zusammenfassend konnten im vorliegenden Kollektiv eine hohe Anzahl chromosomaler Aberrationen detektiert werden, von denen vierzehn in mindestens 30% der untersuchten Tumoren immer wieder auftraten (Tabelle 5).

Tabelle 5	
CGH-Aberrationen welche in mehr als 30% der Patienten beobachtet wurden	
Chromosom, Arm, Band	Prozentualer Anteil mit Verlusten
17p11-13	65%
18q12-23	58%
1p33-36	46%
6q24,27	40%
19p11-13	39%
8p21-13	37%
22q	37%
9p11-21	31%
	Prozentualer Anteil mit Gewinnen
2q22-34	40%
8q21-24	40%
13q21-31	38%
3q24-27	35%
1q31	31%
4q21-28	31%

3. Ergebnisse

Es wurde überprüft, ob spezifische Aberrationen gehäuft in Kombination auftraten. Eine statistisch signifikante Korrelation bestand zwischen dem Auftreten von Verlusten bei 9p und 17p (exakter Test nach Fisher; $p=0,03$), was auf einen kombinierten Verlust von p53 und INK4A hindeutete. Eine andere häufig amplifizierte Region war 8q, welches das MYC Onkogen beheimatet. Obwohl 78% ($n=18$) der Fälle mit Gewinnen auf 8q Verluste auf 17p zeigten, ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Gewinnen auf 8q und Verlusten auf 9p und 17p (exakter Test nach Fisher; p =nicht signifikant).

3.10 Korrelation der CGH-Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern

Um zu überprüfen, ob eine Tumorprogression mit dem Ausmaß der genomischen Instabilität korrelierte, wurden die chromosomalen Aberrationen mit dem Tumorstadium, dem Nodalstatus und der Tumordifferenzierung verglichen. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen vermehrten chromosomalen Aberrationen und fortgeschrittenem Tumorstadium, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen oder der Tumordifferenzierung wurde nicht beobachtet. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen einer höheren Anzahl an chromosomalen Aberrationen und einem fortgeschrittenen pT-Stadium nachgewiesen werden (Mann-Whitney Test: $p=0,03$) sowie ein Trend zu einer Korrelation zwischen einer höheren Anzahl an chromosomalen Verlusten und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Mann-Whitney Test: $p=0,09$).

Von den klinisch-pathologischen Parametern konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Verlusten der 9p11-21 Region und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden: Fünfzehn (83%) von achtzehn Patienten mit 9p Verlust und Lymphknotenmetastasen standen sechzehn (47%) von vierunddreißig Patienten ohne 9p-Verlust ohne Lymphknotenmetastasen gegenüber (Chi-Quadrat Test, $p=0,025$).

Ferner konnte eine grenzwertige statistisch signifikante Korrelation zwischen 18q Verlusten und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Dreiundzwanzig (74%) von 31 Patienten mit Verlusten von 18q hatten Lymphknotenmetastasen, nur 10 (47%) der einundzwanzig Patienten ohne 18q Verluste zeigten Lymphknotenmetastasen (Chi-Quadrat Test, $p=0,05$).

Weitere statistisch signifikante Korrelationen zwischen den CGH-Aberrationen und anderen erfassten Risikofaktoren wurden nicht nachgewiesen.

3.11 Korrelation der CGH-Ergebnisse mit tumorspezifischem Überleben

Die Überlebensanalysen wurden mit 50 Patienten des Kollektivs durchgeführt. Zwei Patienten wurden ausgeschlossen, weil diese während des Krankenhausaufenthaltes verstarben. Die Todesursachen waren nicht tumorassoziiert.

Ein statistisch signifikanter prognostischer Faktor in der Überlebensanalyse war das Vorliegen einer lymphatischen Metastasierung (log-rank Test: $p=0,001$). Das pT-Stadium und der Differenzierungsgrad zeigten im vorliegenden Patientenkollektiv keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben.

Anschließend wurde die CGH-Matrix, welche aus 362 einzelnen chromosomalen Regionen bestand, auf eine ausschließlich auf die p- und q-Arme reduzierte Matrix reduziert. So entstanden 41 Variablen. Chromosom 19 beheimatet viele CG-reiche Abschnitte, was in der CGH auf Metaphasen keine konstant zuverlässige Auswertung erlaubt [Karhu et al. 1997, Kallioniemi et al. 1994]. Die Aberrationen von Chromosom 19 und dem Y-Chromosom wurden daher von der Analyse ausgeschlossen. Außerdem wurden von den akrozentrischen Chromosomen 13, 14 und 15 ausschließlich die q-Arme analysiert.

Die prognostische Wertigkeit der chromosomalen Gewinne und Verlust wurde mittels des log-rank Testes ermittelt. Keine der chromosomalen Aberrationen, die in mindestens 30% der duktaalen Pankreasadenokarzinome nachgewiesen werden konnten, zeigte eine statistisch signifikante Korrelation mit dem Überleben. Von allen Aberrationen zeigten nur Deletionen des q-Arms von Chromosom 4 einen statistisch signifikanten prognostischen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben in der univariaten Datenanalyse (log-rank: $p=0,03$ Verluste auf dem p-Arm, $p=0,009$ Verluste auf dem q-Arm) (Diagramm 6).

3. Ergebnisse

Statistisch relevante Aberrationen in der univariaten Überlebensanalyse (log-rank Test)					Diagramm 6
Aberration	Anz. Pat.	Anz. Pat. mit tumorassoziertem Versterben	Zensierte Patienten	Medianes Überleben (Monate)	p-Wert (log-rank Test)
4q Verlust					0,009
Ja	42	22	20	17	
Nein	8	7	1	10	
4p Verlust					0,0043
Ja	43	23	20	16	
Nein	7	6	1	10	

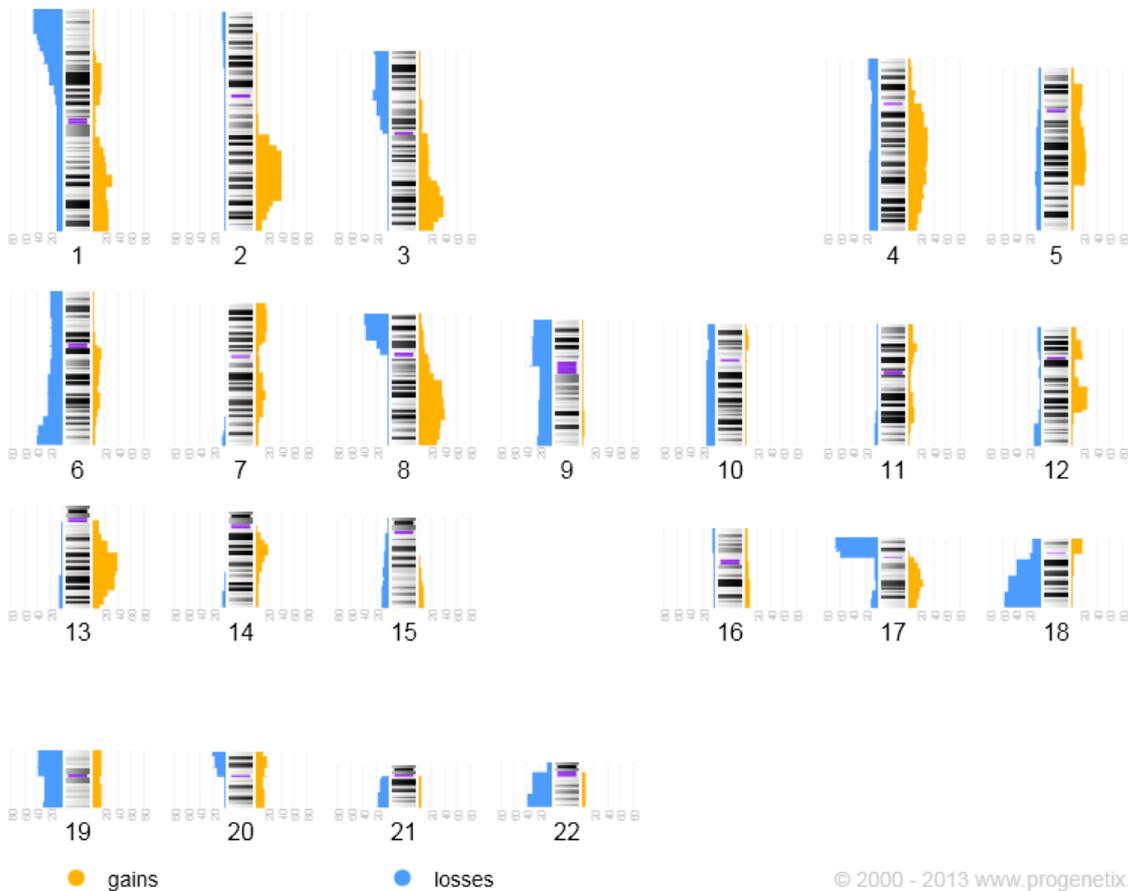
Wenn die log-rank-Daten aller 41 Variablen nach der Benjamini-Hochberg Methode für multiples Testen korrigiert wurden, verloren die Deletionen auf Chromosom 4 ihre prognostische Signifikanz ($p=0,37$). Da ein Verlust der Signifikanz nach Korrektur für multiples Testen eine biologische Signifikanz nicht ausschließt, wurden die Deletionen von Chromosom 4 in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell getestet. Dabei zeigten sich die Deletionen auf dem q-Arm von Chromosom 4 sowie das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen als unabhängige Prognosefaktoren. Eine statistisch signifikante Korrelation mit Deletionen auf dem p-Arm von Chromosom 4 konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise stellten Deletionen auf 4q und Lymphknotenmetastasen auch in der multivariaten Datenanalyse einen unabhängigen prognostischen Faktor für das tumorfreie Überleben dar.

3. Ergebnisse

Abschließend folgte die Einspeisung der CGH-Daten in das Progenetix Projekt, einer Referenzdatenbank für (molekular-) zytogenetische Aberrationen in menschlichen Tumoren (www.progenetix.org; Institute of Molecular Life Sciences Universität Zürich).

Zusammenfassende Darstellung aller genomischen Aberrationen des Kollektivs im progenetix-Format Abbildung 9

Luebke et al. (PMID 22487468, 52 samples)



4. Diskussion

4.1. HER2 und Ploidie von Chromosom 17 beim duktalem Pankreasadenokarzinom

Die untersuchten duktalem Pankreasadenokarzinome konnten anhand ihrer Ploidie für Chromosom 17 in drei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden: Eine disome, eine trisome und eine hyperterasome Gruppe, die alle ein unterschiedliches biologisches Verhalten zeigten.

Die Tumorploidie war in der multivariaten Datenanalyse ein unabhängiger prognostischer Faktor: Die duktalem Pankreasadenokarzinome mit disomer Ploidie verhielten sich klinisch am wenigsten aggressiv und zeigten das längste postoperative Überleben. Die Patienten mit prädominant hyperterasomen Tumoren zeigten einen aggressiveren klinischen Verlauf mit sehr frühem metastatischem Rezidiv und frühem tumorbedingtem Versterben.

Eine bimodale Verteilung bezüglich der Anzahl an zytogenetischen Aberrationen mit unterschiedlichem klinischen Verhalten wurde bereits beschrieben [Hoglund et al. 2001]. Offenbar existieren zumindest zwei unterschiedliche Tumorgruppen mit unterschiedlichem klinischem und biologischem Verhalten. Daher könnte der Chromosom 17-Status ein möglicher Parameter sein, um Patienten mit schlechter Prognose für therapeutische Studien auszuwählen.

Somit würde die Gruppe der diploiden duktalem Pankreasadenokarzinome eine Gruppe von Tumoren mit guter Prognose und einer monoton sinkenden Verteilung zytogenetischer Aberrationen darstellen, ähnlich wie Mamma- und Kolonkarzinome, die häufig lange Überlebenszeiten ausweisen [Hoglund et al. 2001]. Demgegenüber steht die Gruppe der hypertetrasomen Tumore, die den zweiten Typ der bimodalen Verteilung darstellen, mit aggressiven Tumoren und schlechter Prognose. Es wäre von klinischem Interesse, ob derartige Subgruppen auch in anderen bimodalen Tumorentitäten wie zum Beispiel Kopf- und Halstumoren, Lungentumoren und Ovarialkarzinomen existieren.

4. Diskussion

Überraschenderweise hatten weder die HER2-Genamplifikation noch die p185^{HER2}-Überexpression einen Einfluss auf die Prognose der Patienten, wie es für die Tumorploidie nachgewiesen werden konnte, obwohl eine HER2-Genamplifikation im untersuchten Kollektiv beim duktalem Pankreasadenokarzinom ein häufiges Ereignis war (24%). Vergleichbare Studien zeigten bei ähnlicher Häufigkeit der HER2-Amplifikation jedoch ebenfalls keinen prognostischen Effekt [Tsiambas et al. 2006].

Eine Teil der HER2-amplifizierten duktalem Pankreasadenokarzinome zeigte intrachromosomale high-level Amplifikationen in Form von homogeneously stained regions (HSRs) [Kallioniemi et al. 1992], welche mit einer starken Proteinepression assoziiert waren (HercepTest Score 3+).

Von den untersuchten 12 Tumoren mit low-level Amplifikation bzw. vermehrten Einzelsignalen für HER2 zeigte nur ein Tumor eine 2+ Proteinüberexpression von p185^{HER2}. Es bleibt unklar, ob dies eine Amplifikation des 17q12 Locus in Form von double minutes, eine andere Art der Genamplifikation oder einen DNA-Gewinn im 17q12 Genlocus darstellt. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf weitere Gene, welche bei der Progression des duktalem Pankreasadenokarzinoms von Bedeutung sein könnten, denn Genvermehrungen auf 17q sind bereits berichtet worden [Mahlamäki et al. 1997, Harada et al. 2002].

Man könnte folgern, dass eine low-level Amplifikation beim duktalem Pankreasadenokarzinom - im Gegensatz zur high-level Amplifikation in Form von HSRs - in der Regel nicht zu einer starken Proteinüberexpression führt. Die Mehrzahl der Tumore mit HER2-Genamplifikation zeigte keine Überexpression p185^{HER2}. Bei diesen Tumoren kamen klare einzelne Hybridisierungssignale zur Darstellung, welche eine Ratio gegenüber den Hybridisierungssignalen für Chromosom 17 von größer als 2 aufwiesen.

Der direkte Vergleich mit anderen Studien gestaltet sich in der Regel schwierig, da in den untersuchten Kollektiven nicht von allen Gewebeprobe sowohl eine HER2-Immunhistochemie als auch eine FISH bzw. CISH durchgeführt wurden oder keine

4. Diskussion

standardisierten Verfahren zur Evaluation der HER2-Amplifikation stattfanden [Safran et al. 2001, Safran et al. 2004, Harder et al. 2012].

Eine vergleichbare Arbeit von Tsiambas [Tsiambas et al. 2006] mit ebenfalls 50 untersuchten duktalem Pankreasadenokarzinomen zeigte ähnliche Häufigkeiten der HER2-Amplifikation (16%) und p185^{HER2}-Überexpression (20%). Eine HER2-Amplifikation ging nicht stetig mit einer Proteinüberexpression von p185^{HER2} einher, sondern zeigte eine variable Expression von p185^{HER2}. Leider wurde nicht im Detail erwähnt, ob die drei Tumore mit high-level Amplifikation HSRs zeigten. Es wäre von größtem Interesse, ob auch in diesem Kollektiv eine intrachromosomale high-level Amplifikationen in Form von homogeneously stained regions immer mit einer 3+ Proteinüberexpression von p185^{HER2} einhergegangen ist.

Beim Mammakarzinom stellen sogenannte homogeneously stained regions die häufigste Art der HER2-Amplifikation dar und induzieren in 95% eine Überexpression von p185^{HER2} [Kallioniemi et al. 1992]. Offenbar resultiert auch beim duktalem Pankreasadenokarzinom die high-level HER2-Genamplifikation in einer starken p185^{HER2}-Überexpression - wenn auch weniger häufig als beim Mammakarzinom.

Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper gegen p185^{HER2} (Trastuzumab) das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien mit p185^{HER2}-Überexpression in vitro und in vivo hindert [Buchler 2001]. Somit könnten Patienten mit high-level HER2-Amplifikation und p185^{HER2}-Überexpression von einer Immuntherapie profitieren. Die erste multizentrische Phase II Studie mit Verwendung von Trastuzumab und Capecitabin bei Patienten mit metastasiertem duktalem Pankreasadenokarzinom und p185^{HER2}-Überexpression zeigte keinen Vorteil im Vergleich mit den bestehenden Chemotherapiestandards [Harder et al. 2012]. Die Einteilung in die unterschiedlichen Studiengruppen erfolgte primär jedoch anhand der p185^{HER2}-Überexpression. Bei einem HercepTest-Ergebnis von 3+ wurden die Patienten in die Studie aufgenommen, ohne den HER2-Genstatus zu überprüfen. Dies erfolgte jedoch retrospektiv und zeigte, dass eine 3+ p185^{HER2}-Überexpression nur in 64% der Fälle mit einer HER2-Amplifikation assoziiert war. Nur die Patienten mit einem HercepTest von 2+ wurden parallel vor der Einteilung mittels CISH untersucht, von diesen zeigte

ein Patient von 22 eine HER2-Amplifikation. Ferner existierte keine Vergleichsgruppe mit p185^{HER2}-Überexpression und konventioneller Chemotherapie.

Möglicherweise ist es noch zu früh, Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom und einer high-level HER2-Genamplifikation in Form von homogeneously stained regions von einer adjuvanten Therapie mit Antikörpern gegen p185^{HER2} auszuschließen. Zum einen ist zu berücksichtigen, dass die Biologie der duktalem Pankeaskarzinome Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit der des Mammakarzinoms aufweist, bei dem die Therapie mit z.B. Trastuzumab zum leitliniengerechtem Standard gehört. Offenbar existiert eine Subgruppe von duktalem Pankreasadenokarzinomen, welche auch eine high-level HER2-Amplifikation aufweisen, die konsekutiv in einer starken p185^{HER2}-Überexpression resultiert. Diese Patienten könnten theoretisch von einer adjuvanten Therapie analog zum Mammakarzinom profitieren. Ein entsprechendes Patientenkollektiv ist bislang nicht untersucht worden. Daher wäre es von außerordentlichem Interesse ob eine solche Subgruppe von einer adjuvanten Anti-HER2-Therapie profitieren würde, zumal die Wirksamkeit in vitro und in vivo bereits nachgewiesen wurde.

In der komplexen Biologie des duktalem Pankreasadenokarzinoms existieren jedoch viele weitere genomische Alterationen, wie zum Beispiel die häufige Mutation von KRAS (60-70%), welche die Wirksamkeit einer Anti-HER2-Therapie beeinträchtigen könnte [Vaccaro et al.].

Ein weiterer hemmender Faktor ist die bereits ausführlich beschriebene desmoplastische Stromareaktion beim duktalem Pankreasadenokarzinom. Es ist plausibel, dass trotz prinzipiell wirksamer Antikörper das therapeutische Target die "desmoplastische Mauer" nicht durchdringen könnte.

4.2 CGH beim duktalem Pankreasadenokarzinom

Um einen Überblick über alle chromosomalen Veränderungen beim duktalem Pankreasadenokarzinom zu gewinnen, wurden an einem Kollektiv von 52 Patienten eine konventionelle CGH durchgeführt. Nur Verluste auf dem q-Arm von Chromosom 4 waren von unabhängiger prognostischer Signifikanz, die jedoch nach Korrektur für multiples Testen verschwand. Dennoch besteht die Notwendigkeit, die Verluste auf Chromosom 4q in weiteren Patientenkollektiven mit duktalem Pankreasadenokarzinom zu untersuchen, beispielsweise mit spezifischen FISH-Sonden, zumal die Verluste auf Chromosom 4q mit einer Häufigkeit von 16% im untersuchten Kollektiv ein relativ seltenes Ereignis darstellten. Jedoch ist die relativ geringe Häufigkeit von Verlusten auf Chromosom 4q konform mit den Ergebnissen vorangegangener CGH-Studien [Baudis 2010].

Aufgrund der relativ geringen Auflösung der konventionellen CGH und der konsekutiv verminderten Auflösung für die Überlebensanalyse können die durchgeführten Untersuchungen naturgemäß keinen Hinweis auf konkrete Zielgene geben, die in Assoziation mit der Karzinomentstehung und der Progression stehen.

Ausgeprägte Verluste auf Chromosom 4 zeigten eine prognostische Signifikanz bei Karzinomen der Mundhöhle [Lin et al. 2002], beim kolorektalen Karzinom [De Angelis et al. 2001] und beim Hepatoblastom [Arai et al. 2010]. Ferner waren Deletionen bei 4q12-q32 beim Bronchialkarzinom mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark assoziiert, somit ein Hinweis auf eine mögliche Relevanz für eine systemische Tumorprogression [Wrage et al. 2009].

Der Hauptteil der CGH-Studien beim duktalem Pankreasadenokarzinom wurde an lokal fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren der UICC Stadien Iva und IVb vorgenommen. Eine vollständige Übersicht gibt Tabelle 1. Außerdem wurden die vorangegangenen Studien häufig an kleinen und heterogenen Patientenkollektiven durchgeführt. Nur vereinzelt korrelierten die CGH-Ergebnisse mit klinischen Beobachtungsdaten wie bei Schleicher [Schleicher et al. 2007]. Die Gruppe identifizierte eine Genvermehrung auf Chromosom 8q als prognostischen Faktor assoziiert mit einem schlechteren Überleben. Von den 32 untersuchten

4. Diskussion

Pankreastumoren waren jedoch nur 25 duktale Pankreasadenokarzinome und es wurde keine Mikrodissektion durchgeführt. Dies erklärt möglicherweise die geringe Aberrationshäufigkeit von 4,23 in dieser Studie.

Um ein homogeneres Tumorkollektiv zu erstellen, wurden 52 histologisch aufgearbeitete und bestätigte duktale Pankreasadenokarzinome zusammengestellt, welche kurativ (R0) reseziert wurden. Dieses stellt das bislang größte Kollektiv von resezierten Pankreaskarziomen mit klinischen Nachbeobachtungsdaten dar welches mit konventioneller CGH untersucht wurde.

Ein Hauptschwierigkeit bei der Gewinnung von Tumorzellen für die CGH stellt die teils stark ausgeprägte desmoplastische Reaktion beim duktalem Pankreasadenokarzinom dar, was die Auflösung der CGH durch den potentiell hohen Anteil an Normalgewebe in der Gewebeprobe sensibel beeinträchtigen kann. Daher wurde die Lasermikrodissektion zur Isolierung „reiner“ Tumorzellverbände verwendet und die gewonnene Tumor-DNA nach der SCOMP-Methode amplifiziert. Studien ohne Zuhilfenahme der Lasermikrodissektion zeigten geringere Aberrationshäufigkeiten und enthielten auch Tumorproben ohne strukturelle Aberrationen. In der vorliegenden Arbeit zeigen alle Gewebeproben der duktalem Pankreasadenokarzinome chromosomale Veränderungen mit einer insgesamt hohen Frequenz, einhergehend mit der bekannten chromosomalen Instabilität beim duktalem Pankreasadenokarzinom.

Die häufigsten Genvermehrungen waren bei on 2q, 8q, 4q, 3q, 1q und 13q, die häufigsten Verluste bei on 17p, 18q, 19p, 6q, 8p, 9p, 22q und 1p lokalisiert. Generell waren diese Veränderungen mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien kompatibel (Tabelle 1).

CGH-Studien an Zell-Linien von duktalem Pankreasadenokarzinomen zeigten die häufigsten chromosomalen Veränderungen mit gering alteriertem Verteilungsmuster und zusätzlich häufigeren Genvermehrungen bei 5p, 7p und 20q, bei zusätzlichen Verlusten bei 17q und 21q [Mahlamäki et al. 2002, Fukushige et al. 1997, Tirado et al. 1999, Ghadimi et al. 1999]. Diese Abweichungen sind möglicherweise durch die

4. Diskussion

Langzeit-Kultur bei vorbestehender genomischer Instabilität zu erklären, da derartige Veränderungen nicht in primären Tumorproben nachgewiesen wurden.

Obwohl einige der oben genannten chromosomalen Lokalisationen Onkogene und Tumorsuppressorgene beherbergen, die für die Entstehung und Progression des duktales Pankreasadenokarzinoms bedeutsam sind, ist die tatsächliche Bedeutung der meisten chromosomalen Alterationen weitgehend unklar. Keine der häufigeren Alterationen (mehr als 30%) zeigte im untersuchten Kollektiv eine prognostische Relevanz, die hohe Frequenz an chromosomalen Veränderungen lässt jedoch an eine Bedeutung für die Tumorprogression denken.

Die häufigste Alteration war ein Verlust auf dem p-Arm von Chromosom 17, der das Tumorsuppressorgen p53 beherbergt (Lokalisation: 17p13). Die häufigste Genvermehrung kam in der Lokalisation 8q24 zur Darstellung, auf welchem das MYC Onkogen lokalisiert ist. Aufgrund der geringen Auflösungskapazität der konventionellen Metaphasen CGH mit 5-10 Mbp wäre der Rückschluss auf eine mögliche Beteiligung von p53 und MYC jedoch sehr spekulativ.

Eine Möglichkeit der weiteren Investigation wäre die Untersuchung mit hochauflösenden Methoden wie der Array-CGH [Harada et al. 2009], um die zugrundeliegenden Gene und Genregionen zu identifizieren, die ursächlich an der Entstehung der chromosomalen Instabilität beteiligt sind.

4. Diskussion

Übersicht der CGH-Daten für das duktale Pankreasadenokarzinom (ohne Daten aus Zell-Linien)											Tabelle 1		
CGH Methode	Patienten (n)	Material	UICC I	UICC II	UICC III	UICC IV	Frequent losses	Prognostische Daten	Proben ohne Aberrationen	Mikrodissektion	AMP	Jahr	Autoren
mCGH	27	kryo	6	9	1	4	16p, 20q, 22q, 17q, 7q, 8q	nein	4	nein	nein	1996	Solinas-Toldo et al.
mCGH	6	kryo	0	1	1	4	7p, 8q, 11q, 20q	nein	k.a.	nein	nein	1997	Fukushige et al.
mCGH	13	kryo	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	7p, 8q, 5p, 5q, 11p, 12p, 18q	nein	7	nein	nein	1997	Mahlamäki et al.
mCGH	33	kryo/FFPE	8	19	2	4	5p, 8q, 12p, 19q, 20q	nein	11	nein	nein	2000	Schlegel et al.
mCGH	20	kryo	0	1	5	14	8q, 3q, 20q, 7p, 1q, 13q	nein	0	M	DOP	2002	Harada et al.
mCGH	27	kryo	4	11	7	5	8q, 7q, 1q	nein	0	nein	nein	2003	Lin et al.
aCGH	5	kryo	0	0	4	1	7p, 8q, 11q, 20q, 7q, 12q, 17q	nein	0	nein	nein	2004	Holzmann et al.
mCGH	15	Abklatsch	0	5	6	4	5p, 8q, 20q, 1q, 7p, 12p	nein	0	L	DOP	2005	Kitoh et al.
aCGH	17	Xeno	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	7,8q, 11p, 1q, 20	nein	0	nein	nein	2005	Nowak et al.
aCGH	23	kryo	0	1	4	18	1q, 2, 3q, 5, 7, 8q, 12p	nein	0	M	nein	2007	Harada et al.
mCGH	33	FFPE	5	8	15	5	8q, 13q, 18p, 3q, 9p, 12p	ja	5	M	nein	2007	Schleicher et al.
aCGH	27	kryo	0	1	3	16	8q, 1q, 2, 3, 5, 7p, 11, 14q, 17q	nein	0	M	nein	2008	Harada et al.
aCGH	23	kryo	0	1	4	18	7q, 12p, 19q, 6q, 7p, 8p, 5q	nein	1	M	nein	2009	Harada et al.
Legende: mCGH		Metaphasen CGH											
aCGH		Array CGH											
kryo		kryoasserviertes Frischmaterial											
FFPE		formaliniertes Material											
k.a.		keine Angabe											
M		manuelle Mikrodissektion											
L		Lasermikrodissektion											
Abklatsch		Abklatschpräparat											
DOP		degenerated oligonucleotide PCR											

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Kollektiv von 50 Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom die Häufigkeit der HER2-Genamplifikation und der Ploidiegrad mittels Chromosom 17 ermittelt. Eine HER2-Genamplifikation war mit 24% ein häufiges Ereignis, führte aber nur bei high-level Amplifikation zu einer p185^{HER}-Überexpression (4% der Fälle). Weder die HER2-Amplifikation noch die p185^{HER}-Überexpression zeigten eine prognostische Signifikanz. Anhand der Ploidie von Chromosom 17 konnten die Tumore in eine disome (n=19), eine trisome (n=19) und eine hypertetrasome Gruppe (n=12) aufgeteilt werden. Die Aneuploidie für Chromosom 17 stellte sich dabei als signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben heraus.

Anschließend wurden bei einem Kollektiv von 52 Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom mittels Lasermikrodissektion Tumorzellen isoliert, nach der SCOMP Methode global amplifiziert und anschließend mittels komparativer genomischer Hybridisierung auf Metaphasen analysiert. Die häufigsten Genvermehrungen waren bei on 2q, 8q, 4q, 3q, 1q und 13q, die häufigsten Verluste bei on 17p, 18q, 19p, 6q, 8p, 9p, 22q und 1p lokalisiert. Generell waren diese Veränderungen mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studien kompatibel. Dabei zeigten sich die Deletionen auf dem q-Arm von Chromosom 4 sowie das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen als unabhängige Prognosefaktoren. Die Deletionen auf 4q und Lymphknotenmetastasen stellten auch in der multivariaten Datenanalyse einen unabhängigen prognostischen Faktor für das tumorfreie Überleben dar.

Eine Möglichkeit der weiteren Investigation wäre die Untersuchung mit hochauflösenden Methoden wie der Array-CGH, um die zugrundeliegenden Gene und Genregionen zu identifizieren, die ursächlich an der Entstehung der chromosomalen Instabilität beteiligt sind.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaare
AIC	Akaike information criterion
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled Device
CI	chromosomaler Index
CNI	copy number index
CISH	Chromogene in-situ Hybridisierung
CGH	komparative genomische Hybridisierung
Cy 3.5	Cyanin dye 3.5
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dig	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate (dUTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat,
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Floureszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
HCl	Chlorwasserstoff
M	molar
min	Minute
PBS	phosphate buffered saline bzw. phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämaglutinin
RNA	Ribonucleinsäure
RMPI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Zellkulturmedium
sec	Sekunde
SSC	saline sodium citrate bzw. NaCl-Natriumcitrat Puffer

6. Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T	Thymin
Upm	Umdrehungen pro Minute

7. Literaturverzeichnis

Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC et al. (2007) S3-Guidelines „Exocrine pancreatic cancer“ 2007. *Z Gastroenterol* 45:487-523.

Aichler M, Seiler C, Tost M et al (2012) Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol* 226:723-734.

Anderson KE, Mack TM, Silverman DT (2006) Cancer of the pancreas. In: *Cancer Epidemiology and Prevention*. Schottenfeld D, Fraumine JF, eds. Oxford University Press: Oxford, pp. 721-762.

Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, et al. (2010) Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and mdm4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*;49:596-609.

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, et al. (2000) Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*;406:641-5.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK, ToGA Trial Investigators (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376: 687-697.

Bardeesy N, DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*;2:897-909.

Bashyam MD, Bair R, Kim YH, Wang P, Hernandez-Boussard T, Karikari CA, et al. (2005) Array-based comparative genomic hybridization identifies localized DNA amplifications and homozygous deletions in pancreatic cancer. *Neoplasia*;7:556-62.

Bartow SA, Mukai K, Rosai J (1981) Pseudoneoplastic proliferation of endocrine cells in pancreatic fibrosis. *Cancer*. Jun 1;47(11):2627-33.

Bluemke DA, Cameron JL, Hruban RH, Pitt HA, Siegelman SS, Soyer P, Fishman EK (1995) Potentially resectable pancreatic adenocarcinoma: spiral CT assessment with surgical and pathologic correlation. *Radiology*, Nov;197(2):381-5.

Baudis M (2010) Progenetix oncogenomic online resource, <http://www.Progenetix.Net>.

Bosman FT, Carneiro, F, Hruban RH, Theise ND (2010) WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition, IARC, S. 279-291.

Buchler P, Reber HA, Buchler MC, et al (2001) Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin). *J Gastrointest Surg* 5:139-146.

7. Literaturverzeichnis

Burnham KP, Anderson DR (2002) Model Selection and Multimodel Interference (ed 2). New York, Springer.

Campman SC, Fajardo MA, Rippon MB et al (1997) Adenosquamous carcinoma arising in a mucinous cystadenoma of the pancreas. *J Surg Oncol* 64:159-162.

Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM (2005) Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*. Aug;129(2):504-11.

Chu D, Kohlmann W, Adler DG (2010) Identification and screening of individuals at increased risk for pancreatic cancer with emphasis on known environmental and genetic factors and hereditary syndromes. *JOP* 11:203-212.

Costa J (1977) Benign epithelial inclusions in pancreatic nerves. *Am J Clin Pathol*. Mar; 67(3):306-7.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*; 230:1132-9.

Day JD, DiGiuseppe JA, Yeo C, et al (1996) Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 27:119-124.

De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, Mjåland O, Clausen OP (2001) Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorec Dis*;16: 38-45.

DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature*;408:248-54.

Deutsche Krebsgesellschaft (2012) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 3.0, Aktualisierung 2012 AWMF-Register-Nummer: 032-045OL, S.210-212

Distler M, Grützmann R (2012) Neue Aspekte in der Chirurgie des Pankreaskarzinoms Prinzipien – Ergebnisse – Evidenz, *Pathologe [Suppl 2]* 33:258-265.

Dugan MC, Dergham ST, Kucway R, et al (1997) HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: Relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 14:229-236.

Esposito I, Seiler C, Bergmann F et al (2007) Hypothetical progression model of pancreatic cancer with origin in the centroacinar-acinar compartment. *Pancreas* 35:212-217.

7. Literaturverzeichnis

Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Klöppel G (2012) Neue Einblicke in die Entstehung des Pankreaskarzinoms: Die Rolle der atypischen flachen Läsionen in der Karzinogenesen, *Pathologe* [Suppl 2] 33:189-193.

Fukushige, Waldman F, Kimura M (1997) Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, Jul;19 (3):161-9

Hidalogo M, Pancreatic cancer (2010) *N Engl J Med* 362:1605-1617.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A et al (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4:437-450.

Holly EA, Chaliha I, Bracci PM, Gautam M. (2004) Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area. Holly EA, Chaliha I, Bracci PM, Gautam M. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, Jun;2(6):510-7.

Iacobuzio-Donahue CA, Ryu B, Hruban RH, Kern SE (2002) Exploring the host desmoplastic response to pancreatic carcinoma: gene expression of stromal and neoplastic cells at the site of primary invasion. *Am J Pathol*. Jan;160(1):91-9.

International Agency for Research on Cancer (2007) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans Vol 89. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines.

Iodice S., Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2008) Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 393: 535-545.

Gangi S, Fletcher JG, Nathan MA, Christensen JA, Harmsen WS, Crownhart BS, Chari ST (2004) Time interval between abnormalities seen on CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scans obtained before diagnosis. *AJR Am J Roentgenol*. Apr;182(4):897-903.

Ghadimi BM, Schrock E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer PS, et al.(1999) Specific chromosomal aberrations and amplification of the aib1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol*;154: 525-36.

Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, et al.(1998) Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*;23:81-99.

Harada T, Okita K, Shiraishi K, Kusano N, Kondoh S, Sasaki K (2002) Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res*;62:835-9.

7. Literaturverzeichnis

Harada T, Baril P, Gangeswaran R, Kelly G, Chelala C, Bhakta V, et al. (2007) Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*; 96:373-82.

Harada T, Chelala C, Bhakta V, Chaplin T, Caulee K, Baril P, et al. (2008) Genome-wide DNA copy number analysis in pancreatic cancer using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*;27:1951-60.

Harada T, Chelala C, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR (2009) Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques. *Pancreatology*; 9:13-24.

Harder J, Ihorst G, Heinemann V, Hofheinz R, Moehler M, Buechler P, Kloeppe G, Röcken C, Bitzer M, Boeck S, Endlicher E, Reinacher-Schick A, Schmoor C, Geissler M (2012) Multicentre phase II trial of trastuzumab and capecitabine in patients with HER2 overexpressing metastatic pancreatic cancer. *Br J Cancer*. Mar 13;106(6):1033-8.

Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N, et al. (2001) Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 31:156-171.

Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, A, et al. (2004) Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res*;64:4428-33.

Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. (2001) The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:151-9.

Jones S, Zhang X, Parsons DW et al (2008) Core signalling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321:1801-1806, 2008.

Kala Z, Válek V, Hlavsa J, Hana K, Vánová A (2007) The role of CT and endoscopic ultrasound in pre-operative staging of pancreatic cancer. *Eur J Radiol*. May;62(2):166-9. Mar 6.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5321-5325.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Gene Chromosome Canc*;10: 231-43.

7. Literaturverzeichnis

Karhu R, Kahkonen M, Kuukasjarvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O (1997) Quality control of cgh: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry*;28:198-205.

Klöppel G, Bommer G, Ruckert K et al (1980) Intra-ductal proliferation in the pancreas and its relationship to human and experimental carcinogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 387:221-233.

Koepfen HK, Wright BD, Burt AD, et al (2001) Overexpression of HER2/neu in solid tumours: An immunohistochemical survey. *Histopathology* 38:96-104.

Kitoh H, Ryozaawa S, Harada T, Kondoh S, Furuya T, Kawauchi S, et al.(2005) Comparative genomic hybridization analysis for pancreatic cancer specimens obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol*;40:511-7.

Koka V, Potti A, Koch M, et al (2002) Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 22:1593-1597.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-9.

Leonhardt H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. Auflage, Thieme, S. 449-451, S. 389-391.

Lin SC, Chen YJ, Kao SY, Hsu MT, Lin CH, Yang SC, et al. (2002) Chromosomal changes in betel-associated oral squamous cell carcinomas and their relationship to clinical parameters. *Oral Oncol*;38:266-73.

Lin M, Cai D, Luo M (2003) Identification of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma using comparative genomic hybridization. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116:1156-60.

Longnecker DS und Terhune PG (1996) The case for parallel classification of biliary tract and pancreatic neoplasm, *Mod Pathol*. Aug;9(8):828-37.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC (1997) Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst*. Mar 19;89(6):442-6.

Mahlamäki EH, Hoglund M, Gorunova L, et al. (1997) Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 383-391.

Mahlamäki EH, Bärlund M, Tanner M, Gorunova L, Höglund M, Karhu R, et al.(2002) Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer*;35:353-8.

7. Literaturverzeichnis

Maser RS, DePinho RA (2002) Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*;297:565-9.

Mendelin J, Grayson M, Wallis T, et al (1999) Analysis of chromosome aneuploidy in breast carcinoma progression by using fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest* 79:387-393.

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J et al (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25:1960-1966.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Tudur Smith C et al (2009) Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials. *Br J Cancer* 100:246-250

Nguyen NQ, Leong RW (2008), *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Oct;23(10):1483-91.

Nowak NJ, Gaile D, Conroy JM, McQuaid D, Cowell J, Carter R, et al. (2005) Genomewide aberrations in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*;161:36-50.

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K et al (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297:267-277.

Pino MS, Chung DC (2010) The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*;138:2059-72.

Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ (1997) The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. Jul 31;15(5):537-47.

Riediger H, Keck T, Wellner U et al (2009) The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 13:1337-1344.

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (gemeinsame Veröffentlichung) (2012) *Krebs in Deutschland 2007/2008*, 8. Ausgabe Robert Koch-Institut, Berlin, S. 48.

Rosai J, Rosai and Ackermanns *Surgical Pathology* (2004) 9th Edition, Mosby, S.1068-1073.

Safran H, Steinhoff M, Mangray S, et al (2001) Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 24:496-499.

Safran H, Iannitti D, Ramanathan R, Schwartz JD, Steinhoff M, Nauman C, Hesketh P, Rathore R, Wolff R, Tantravahi U, Hughes TM, Maia C, Pasquariello T, Goldstein

7. Literaturverzeichnis

L, King T, Tsai JY, Kennedy T (2004) Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. *Cancer Invest.* 2004;22(5):706-12.

Sarnaik AA, Saad AG, Mutema GK et al (2003) Os-teoclast-like giant cell tumor of the pancreas associated with a mucinous cystadenocarcinoma. *Surgery* 133:700-701.

Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Maehara N, Minamishima YA, Nishio S, et al. (2001) Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001 Apr 1;126(1):13-9.

Schleger C, Arens N, Zentgraf H, Bleyl U, Verbeke C (2000) Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH). *J Pathol*;191:27-32.

Schleicher C, Poremba C, Wolters H, Schäfer K-L, Senninger N, Colombo-Benkmann M (2007) Gain of chromosome 8q: a potential prognostic marker in resectable adenocarcinoma of the pancreas? *Ann Surg Oncol*;14: 1327-35.

Schlitter AM, Esposito I (2012) Pathology and classification of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Chirurg* 83:110-115.

Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T (1985) A v-erbB-related protooncogene, c-erbB2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.82, pp.6497-6501.

Shih C, Padhy LC, Murray M (1981): Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290: 261-264.

Shono M, Sato N, Mizumoto K, Maehara N, Nakamura M, Nagai E, et al. (2001) Stepwise progression of centrosome defects associated with local tumor growth and metastatic process of human pancreatic carcinoma cells transplanted orthotopically into nude mice. *Lab Invest*;81:945-52.

Sobin LH, Wittekind C (2002) TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.

Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P (1996) Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*;56:3803-7.

Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, et al. (2002) Scmp is superior to degenerated oligonucleotide primed polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol*;161: 43-51

Tirado CA, Sandberg AA, Stone JF (1999) Identification of a novel amplicon at 1q31 in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*;113:110-4.

7. Literaturverzeichnis

Tsiambas E, Karameris A, Dervenis C, Lazaris AC, Giannakou N, Gerontopoulos K, Patsouris E (2006) HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. *JOP*. May 9;7(3):283-94.

Tzahar E, Yarden Y (1998): Mini-review - The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochem Biophys Acta* 1377: 25-37.

Vaccaro V, Melisi D, Bria E, Cuppone F, Ciuffreda L, Pino MS, Gelibter A, Tortora G, Cognetti F, Milella M (2011) Emerging pathways and future targets for the molecular therapy of pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets*. Oct;15(10):1183-96.

Van Den Berg W, Tascilar M, Offerhaus GJ et al (2000) Pancreatic mucinous cystic neoplasms with sarcomatous stroma: molecular evidence for mono-clonal origin with subsequent divergence of the epithelial and sarcomatous components. *Mod Pathol* 13:86–91.

Van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. (2002) Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*;161:1541-7.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research (eds.) (2007) Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Second Expert Report. AICR: Washington, DC.

Wrage M, Ruosaari S, Eijk PP, Kaifi JT, Hollmen J, Yekebas EF, et al. (2009) Genomic profiles associated with early micrometastasis in lung cancer: relevance of 4q deletion. *Clin Cancer Res* 2009;15:1566-74.

Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, et al (1993) Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 24:1127-1134.

Zamboni G, Scarpa A, Bogina G et al (1999) Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 23:410-42.

8. Publikationsverzeichnis

Aus der vorliegenden Promotionsarbeit entstammen Anteile folgender Publikationen:

Originalarbeiten

Luebke AM, Baudis M, Matthaei H, Vashist YK, Verde PE, Hosch SB, Erbersdobler A, Klein CA, Izbicki JR, Knoefel WT, Stoecklein NH (2012) Losses at chromosome 4q are associated with poor survival in operable ductal pancreatic adenocarcinoma, *Pancreatology* 12, 16-22.

Stoecklein NH, **Luebke AM**, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, Stern F, Scheunemann P, Peiper M, Eisenberger CF, Izbicki JR, Klein CA, Hosch SB (2004) Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2004 Dec 1; 22(23):4737-45.

VORTRÄGE

A.M. Luebke, A. Erbersdobler, M. Baudis, S.B. Hosch, W.T. Knoefel, C.A. Klein, N.H. Stoecklein (2006) Genomisches Profiling bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas mittels SCOMP. 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin.

Andreas M. Luebke, Stefan B. Hosch, Andreas Erbersdobler, Jakob R. Izbicki, Wolfram T. Knoefel and Nikolas H. Stoecklein (2003) Chromosom 17 Aneusomie, aber nicht das Her-2/neu Onkogen ist ein prognostischer Faktor beim operablem Pankreaskarzinom. Düsseldorf-Chirurgischer Forschungstag der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Andreas M. Luebke, Stefan B. Hosch, Andreas Erbersdobler, Jakob R. Izbicki, Wolfram T. Knoefel and Nikolas H. Stoecklein (2003) Aneusomy of Chromosome 17 but not Her-2/neu amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. American Pancreatic Association Meeting, Chicago, Illinois, USA.

A.M. Luebke, N.H. Stoecklein, A. Erbersdobler, P. Scheunemann, W.T. Knoefel, J.R. Izbicki, S.B. Hosch (2002): Her-2/neu beim Pankreaskarzinom. Wissenschaftliches Kolloquium des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

PREISE

AACR-Pezcoller Foundation Scholar-in-Training Award:

Marco Petronio, **Andreas M. Luebke**, Peter Scheunemann, Emre F. Yekebas, Jakob R. Izbicki, Stefan B. Hosch, Christoph A. Klein (2006) Genomic analysis of single disseminated pancreatic tumor cells reveals genetic divergence between haematogenous and lymphatic dissemination. 97th Annual Meeting of the AACR, Washington D.C., USA (Poster 4294).

POSTER

Nikolas H. Stoecklein, **Andreas M. Luebke**, Andreas Erbersdobler, Wolfram T. Knoefel, Winfried Schraut, Franziska Stern, Peter Scheunemann, Jakob R. Izbicki, Wolfram T. Knoefel, and Stefan B. Hosch (2003) Chromosom 17 Aneusomie, aber nicht das Her-2/neu Onkogen, ist ein prognostischer Faktor beim operablen duktalem Pankreaskarzinom. 170. Jahrestagung der Vereinigung westfaelisch-niederrheinischer Chirurgen, Dortmund.

A.M. Luebke, N.H. Stoecklein, A. Erbersdobler, P. Scheunemann, W.T. Knoefel, J.R. Izbicki, S.B. Hosch (2003) HER-2/neu Genamplifikation, Proteinüberexpression und Chromosom 17 Aneuploidie beim duktalem Pankreaskarzinom. 120. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH), München.

Nikolas H Stoecklein, **Andreas M Luebke**, Andreas Erbersdobler, Peter Scheunemann, Jacob R Izbicki, Stefan B Hosch (2002) HER2 als zusätzliche therapeutische Option für selektierte Patienten mit operablem duktalem Pankreaskarzinom. 6. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Köln.

Nikolas H Stoecklein, **Andreas M Luebke**, Andreas Erbersdobler, Peter Scheunemann, Jacob R Izbicki and Stefan B Hosch (2002) HER-2/neu Gene Amplification and Aneuploidy of Chromosome 17 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Digestive Disease Week, San Francisco, Cal., USA, #102870 Abstract ID: 102870.

9. Danksagung

Prof. Dr. Jakob R. Izbicki für die Überlassung des Themas sowie die kritischen Anmerkungen und konstruktiven Diskussionen.

Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein für die exzellente und beispielhafte Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen, die ständige Unterstützung des selbstständigen Arbeitens und die Begleitung meines wissenschaftlichen Weges.

Prof. Dr. Andreas Erbersdobler für die praktische Ausbildung am Mikroskop, ohne die ich die anspruchsvolle Materie der Pathologie des duktales Pankreasadenokarzinoms niemals hätte bewältigen können.

Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel und Prof. Stefan B. Hosch für die tatkräftige Unterstützung und die konstruktiven Beiträge.

Dr. Franziska Stern, die mir insbesondere beim Einstieg in die Laborarbeit und die In-situ-Hybridisierung hilfsbereit zur Seite stand und eine stets heitere und zuverlässige Weggefährtin war.

Dr. Annika Siegmund für den lebhaften Gedankenaustausch und das Teilen der Freude am wissenschaftlichen Arbeiten, die mich motivierte und ermutigte, meinen Wissenshorizont zu erweitern.

Prof. Dr. Shuichi Hokita, Prof. Dr. Sumiya Ishigami und Dr. Hiroshi Higashi für den wissenschaftlichen und herzlichen interkulturellen Austausch während Ihrer Zeit als Gastwissenschaftler im Chirurgischen Forschungslabor in Hamburg.

Prof. Dr. Christoph Klein und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe am Institut für Immunologie an der Münchner Maximilians Universität, welche mich herzlich als Gastwissenschaftler aufgenommen haben, von denen Herrn Manfred Meyer und Dr. Andrea Eberhardt ein besonderer Dank gilt.

9. Danksagung

Prof. Dr. Guido Sauter für die konsequente Motivation beim Verfassen der Dissertationsschrift.

Der Werner Otto Stiftung, die es mir durch die finanzielle Unterstützung überhaupt ermöglichte, mich intensiv der wissenschaftlichen Arbeit zu widmen

Während der Arbeit an der Dissertation begegnete ich vielen Menschen. Jede Begegnung hatte etwas Besonderes und hinterließ einen bleibenden Eindruck in mir als Mensch. Ist es nicht manchmal ein kurzer zwischenmenschlicher Moment, der einem besonders in Erinnerung bleibt und die Begegnung zu etwas Einzigartigem macht? Ich habe in dieser Zeit nicht nur viele Menschen kennengelernt, sondern auch viel über Menschen gelernt. Jede Begegnung hat mich geformt und ich bin allen Weggefährten dafür dankbar.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Andreas M. Lübke