

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Pathologie
Des Zentrums für klinische Pathologie
Prof. Dr. med. G. Sauter

Heterogenität der ESR1-Amplifikation in primären Mammakarzinomen und deren hämatogenen Metastasen

Dissertation

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

Vorgelegt von:
Helen Juliane Haas
aus Berlin
Hamburg, 2013

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.10.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Müller

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Ronald Simon

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Grundlagen des Mammakarzinoms	6
1.1.1 Ätiologie	6
1.1.2 Brustkrebsformen.....	6
1.1.3 Prognosefaktoren.....	7
1.2 Therapie des Mammakarzinoms	8
1.2.1 Chirurgie	8
1.2.2 Strahlentherapie	8
1.2.3 Systemische Therapie	8
1.3 Genetik des Mammakarzinoms	11
1.3.1 Tumorentstehung	11
1.3.2 Genetische Subtypen.....	15
1.3.3 Amplifikationen	15
1.3.4 Her2/Neu-Amplifikation.....	17
1.3.5 Östrogenrezeptoren und ESR1-Amplifikation.....	18
1.4 Metastasierung	19
1.5 Ziel der Studie	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Tissue Micro Array (TMA)-Herstellung	24
2.2 Mammakarzinom-Fernmetastasen-Array	25
2.3 FISH-Analyse	27
2.3.1 FISH-Sondenherstellung	28
2.3.2 Auswertung.....	33
2.4 Immunhistochemie (IHC)	34
2.5 Statistik	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Immunhistochemie versus FISH	35
3.2 Heterogenität innerhalb einer Gewebeprobe	36
3.3 Heterogenität innerhalb der Fernmetastasen	37
3.4 Vergleich von Primärtumoren und den Fernmetastasen	39
3.5 Analysierbarkeit innerhalb der verschiedenen Gewebetypen	41
4 Diskussion	43
4.1 Technische Schwierigkeiten der ESR1-Analyse	44
4.2 Heterogenität	44
4.3 Klinische Relevanz	47
4.4 ESR1-FISH im Vergleich zur ER-IHC	48
4.5 Einordnung in die aktuelle Studienlage	49
5 Zusammenfassung	50
6 Literaturverzeichnis	52
7 Danksagung	61
8 Lebenslauf	62
9 Eidesstattliche Erklärung	63

Abkürzungsverzeichnis

aCGH	Array Comparative genomic hybridization
APC	Adenomatous-polypsis-coli-Protein
BET	Brusterhaltende Therapie
BCL2	B-cell Lymphoma 2
BRCA1/2	Breast Cancer Susceptibility Protein 1/2
Cen 6, C6	Zentromer des Chromosoms 6
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Östrogenrezeptor
ER-alpha	Östrogenrezeptor-alpha
ER-beta	Östrogenrezeptor-beta
ESR1	Östrogenrezeptor-alpha-Gen
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
Her2/Neu, HER2	Human Epidermal Growth Factor
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IGF	Insulin-like Groth Factor
IHC	Immunhistochemie
IS	Intensity Score
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LCIS	Lobuläres Carcinoma in Situ
NFκB	Nuclear Factor-KappaB
NOS	Not otherwise specified
PAX2	Paired Box Gene 2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PS	Proportion Score
RB1	Retinoblastoma 1
TGFα	Transforming Growth Factor-alpha
TMA	Tissue Micro Array
TS	Total Score nach Allred
UICC	Union of International Cancer
WHO	World Health Organisation

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1:** Modell der klassischen Tumorprogression
- Abbildung 2:** Modell der molekularpathologischen Tumorprogression
- Abbildung 3:** Verantwortliche Genprodukte für die Ausbildung von Fernmetastasen beim Mammakarzinom
- Abbildung 4:** Gewinnung der auf dem Tissue Micro Array aufgebrachten Gewebezyylinder aus dem „Donor-Gewebe“ mit einem Array-Stanzgerät
- Abbildung 5:** Konstruktion eines Tissue Micro Array
- Abbildung 6:** Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnitt eines Tissue Micro Arrays
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung des TMA-Aufbaus
- Abbildung 8:** ESR1-/Zentromer 6-Resultate der FISH-Untersuchung
- Abbildung 9:** Gewebeslots mit ESR1-Amplifikation und starker nukleärer Expression des Östrogenrezeptor-Proteins
- Abbildung 10:** Vergleich des ESR1-Status zwischen Primärtumor und den verschiedenen Fernmetastasen
- Abbildung 11:** Vergleich des ER-Status zwischen Primärtumor und den verschiedenen Fernmetastasen
- Abbildung 12:** ESR1- und ER-Status der Patientin #104
- Abbildung 13:** Analysierbarkeit der unterschiedlichen Gewebetypen
- Tabelle 1:** Zusammensetzung des Metastasen-TMA
- Tabelle 2:** Der Allred-Score, eine Punkteskala von 0 bis 8, ist die Summe aus dem Proportion Score und dem Intensity Score
- Tabelle 3:** Zehn diskrepante Fälle der IHC
- Tabelle 4:** Zehn exemplarische Fälle der diskrepanten FISH-Ergebnisse
- Tabelle 5:** Vier exemplarische Fälle der diskrepanten FISH-Ergebnisse mit den entsprechenden Resultaten der IHC
- Tabelle 6:** Fallbeispiel der Patientin #39

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Mammakarzinoms

1.1.1 Ätiologie

Das Mammakarzinom ist mit einem Anteil von 25% die häufigste aller malignen Tumorerkrankungen der Frau. Laut dem Bundesministerium für Gesundheit erkranken jährlich 110 von 100.000 Frauen neu an Brustkrebs, wonach jede achte bis zehnte Frau in ihrem Leben ein Mammakarzinom entwickelt; dabei ist das Erkrankungsrisiko vom Alter abhängig und steigt mit zunehmendem Lebensalter. In der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frau ist Brustkrebs die häufigste Todesursache (westliche Welt). Weltweit werden circa 350.000 Todesfälle im Jahr verzeichnet (Psiani et al. 1999).

Die globale Inzidenz des Mammakarzinoms zeigt geographische Unterschiede: Im Heimatland lebende Japanerinnen erkranken zum Beispiel deutlich seltener an Brustkrebs als Europäerinnen (das Verhältnis der Neuerkrankungen zwischen Europa und Japan beträgt 6:1), die Inzidenzrate der nach Amerika ausgewanderten Japanerinnen ist jedoch erhöht, bei deren dort aufgewachsenen Töchtern sogar noch höher. Das deutet darauf hin, dass neben genetischen Faktoren möglicherweise unterschiedliche Lebensgewohnheiten (z. B. Ernährung, Adipositas, Hüftumfang) eine Rolle für das Erkrankungsrisiko spielen (Inumaru et al. 2011). Auch die postmenopausale Hormonersatztherapie, hier insbesondere eine Kombination aus Östrogen und Progesteron, scheint, vergleicht man diese mit einer Östrogen-Monotherapie, das Brustkrebsrisiko zu erhöhen. Ein besonderer Zusammenhang wurde gefunden beim Auftreten von Hormon-positiven und wenig differenzierten Tumoren (Narod 2011).

1.1.2 Brustkrebsformen

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Tumorerkrankung, die sich unterschiedlich im Bezug auf Verlauf, Prognose und Therapie verhält. Invasive Mammakarzinome entwickeln sich aus präinvasiven Vorstufen (Carcinoma in situ), die sich häufig in der Mammographie als sogenannte Mikroverkalkungen darstellen lassen. Das Carcinoma in situ ist gekennzeichnet durch eine neoplastische Proliferation von malignen epithelialen Zellen. Es ist getrennt vom Bindegewebe durch eine intakte Basalmembran. Zu unterscheiden sind das wesentlich häufigere duktale und das lobuläre Carcinoma in situ (DCIS bzw. LCIS). Das invasive Mammakarzinom ist ein infiltrativ wachsender, d. h. die Basalmembran überschreitender, maligner epithelialer Tumor, der aus seiner Vorstufe, dem Carcinoma in

situ, entsteht. Die gängige histologische Einteilung der World Health Organisation (WHO) beschreibt unter vielen anderen die des invasiv-lobulären Karzinoms und die des invasiv-duktales Karzinoms (Tavassoli und Devilee b 2003).

Das lobuläre Mammakarzinom, histologisch gekennzeichnet durch ein dissoziiertes Wachstum, ist mit 10-20% aller Mammakarzinome wesentlich seltener. Dabei sind die Tumorzellen vereinzelt oder in charakteristischen Gruppierungen, wie dem Gänsemarsch- oder dem Schießscheibenmuster angeordnet. Diese Tumorentität weist eine genetische Besonderheit auf. Eine Mutation im E-Cadherin-Gen mit Verlust der Expression dieses Adhäsionsmoleküls führt zu einer ausgeprägten und frühen Metastasierungsbereitschaft dieser Karzinome (Campbell et al. 2011).

Das invasiv-duktales Karzinom stellt die häufigste Form des Mammakarzinoms dar. Je nach Wachstumsmuster unterscheidet man histologisch mehrere Subtypen, wobei ungefähr 60 % dieser Tumorunterklasse nicht mehr spezifizierbar sind und als NOS (not otherwise specified) bezeichnet werden (Tavassoli und Devilee a 2003). Daneben existieren weitere Formen epithelialer, maligner Tumore: das medulläre, tubuläre, papilläre und das muzinöse Karzinom u. v. m.

1.1.3 Prognosefaktoren

Um den Verlauf und den Therapieerfolg der Tumorerkrankung annähernd voraussagbar zu machen, gibt es bestimmte Prognosefaktoren. Die Prognose wird beeinflusst vom histologischen Tumortyp. So hat zum Beispiel das invasiv-duktales Karzinom eine schlechtere Prognose, was die 10 Jahres-Überlebensrate betrifft, als zum Beispiel das medulläre Karzinom. Der wichtigste Prognosefaktor ist das Staging. Hierbei werden die Parameter Größe des Tumors, Lymphknotenbefall und das Vorhandensein von Fernmetastasen erfasst. Diese Parameter sind in der so genannten TNM Klassifikation der Union of International Cancer (UICC) zusammengefasst. Weitere Prognosekriterien sind das Grading, bei welchem der Differenzierungsgrad histologisch bewertet wird. Gängig ist heute die Einteilung nach Elston und Ellis (Robbins et al. 1995). Zur Einteilung werden die Art der Drüsenbildung, Kernatypien und die Anzahl der Mitosen herangezogen. Diese ergeben eine Gradeinteilung über die Differenzierung eines Mammakarzinoms von 1 bis 3, wobei 1 für eine gute Differenzierung, 3 hingegen für einen undifferenzierten Tumor steht (Tavassoli und Devilee b 2003). Auskunft über die Prognose geben auch Lymph- und Gefäßeinbrüche, wie auch der Befall der Mamille oder der Haut, die prognostisch ungünstig zu bewerten sind. Neben diesen allgemeinen Pathogenitätsfaktoren eines

malignen Tumors spielt beim Mammakarzinom der Hormonrezeptorstatus eine wesentliche Rolle hinsichtlich prognostischer und therapeutischer Faktoren. Unterschieden werden hier Östrogen- bzw. Progesteron-exprimierende Tumore, welche mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind, von Hormonrezeptor-negativen Tumoren. Diese zeigen in der Immunhistochemie keine Expression des Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors. Ein weiterer Prognosefaktor ist der Her2-Rezeptor-Status. Her2-Rezeptoren an der Oberfläche der Tumorzelle sind Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren, welche in den Teilungszyklus der Zelle eingreifen. Exprimiert ein Mammakarzinom Her2-Rezeptoren, ist das mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert (Colombo et al. 2011).

1.2 Therapie des Mammakarzinoms

1.2.1 Chirurgie

Die erste Säule der Therapie ist der chirurgische Eingriff. Ziel der Operation ist die Tumorfreiheit der Brust und der regionären Lymphknoten zu erreichen. Wobei heutzutage meist auf eine radikale Mastektomie verzichtet wird. Angewandt werden häufig die Ablatio mammae mit Axillarevision oder die Brusterhaltende Therapie (BET). Diese sollte zum Einsatz kommen, wenn die Tumorgöße es zulässt und keine Infiltration von Muskel oder Hautgewebe zu erkennen ist. Aber auch wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Fernmetastasierung vorliegt. In diesem Fall hängt die Prognose nicht vom Lokalbefund ab und die Nebenwirkungen und Folgeerscheinungen der OP sind zu minimieren. Eine Lymphonodektomie gehört bei beiden Verfahren zum Standard, da der Lymphknotenstatus ein wichtiges Diagnosekriterium ist. Vor der OP gibt es die Möglichkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie, um einen inoperablen Tumor auf eine operable Größe zu bringen.

1.2.2 Strahlentherapie

Die zweite Säule bildet die Strahlentherapie. Eine primäre Bestrahlung ist möglich bei inoperablen Patientinnen, hat allerdings rein palliativen Charakter. Eine postoperative Bestrahlung ist bei Brusterhaltender Therapie obligat und sollte nach einer Mastektomie von größeren Tumoren insbesondere bei Hautinfiltration und Lymphangiosis empfohlen werden.

1.2.3 Systemische Therapie

Die dritte Säule bildet die systemische Therapie. Sie lässt sich unterteilen in die Chemotherapie und in die endokrine Therapie (Zuckerschwerdt a 2008). Wann eine

systemische Therapie angewendet wird, hängt vom Risiko eines Rezidivs ab. Eine Polychemotherapie ist besonders effektiv bei prämenopausalen Frauen, weniger bei postmenopausalen (EBCTCG).

Eine endokrine Therapie kann das Wachstum eines Tumors beeinflussen. Östrogen und Progesteron binden an ihre Rezeptoren und regulieren unter anderem das Wachstum von Karzinomzellen. Der Östrogenentzug ist die bedeutsamste Behandlungsweise in der endokrinen Therapie. Tumoren postmenopausaler Frauen sind wesentlich häufiger rezeptorpositiv (circa 80%) als die Mammakarzinome prämenopausaler Frauen. (Köhler und Bässler 1986).

Die Therapie unterscheidet sich dementsprechend auch. Bei prämenopausalen Frauen wird Östrogen vor allem in den Ovarien gebildet. Gute Therapieergebnisse bringen daher eine Ovariectomie oder der medikamentöse Einsatz von GnRH-Agonisten (z. B. Leuprorelin [Eligard®], Buserelin [Profact®]) welche über die Hypophysen-Hypothalamus-Achse die Biosynthese der körpereigenen, ovariellen Steroide hemmen. Bei postmenopausalen Frauen werden Östrogene vor allem in peripheren Geweben produziert. Hier eignen sich zur Therapie sehr gut Hormonantagonisten. Ein Hormonentzug kann die Zellproliferation unterdrücken und auch die Apoptose auslösen (Roberts et al. 2011). Östrogene bewirken nach Bindung an ihren intrazellulären Rezeptor die Synthese von Wachstumsfaktoren, wie z. B. EGF, IGF und TGF α , die das Wachstum der Tumorzellen stimulieren. Somit wirkt die Gabe eines „Antiöstrogens“ antiproliferativ. Eine endokrine Therapie ist meist weniger belastend als eine Polychemotherapie (Zuckerschwerdt b 2008) und wird häufig als Monotherapie, aber auch in Kombination mit einer Chemotherapie verabreicht. Zu den Antiöstrogenen gehören die Östrogenrezeptor-Antagonisten (Tamoxifen®) und die Aromatasehemmer. Tamoxifen® bindet an den Östrogenrezeptor und hemmt so die Expression von Östrogen-regulierten Genen. So werden z. B. Wachstumsfaktoren und Promotoren der Angiogenese gehemmt. Auch soll Tamoxifen® die Apoptose der Zelle induzieren können (De Medina et al. 2009). Tamoxifen® wird in der adjuvanten Therapie beim Mammakarzinom eingesetzt. Es senkt die Rezidivrate und erhöht die Überlebenszeit (Lao Romera et al. 2011, Baum et al. 1992). Bei metastasierten Mammakarzinomen wird es palliativ eingesetzt. Die Wirkung von Tamoxifen® ist bei postmenopausalen Frauen sehr groß, bei prämenopausalen Frauen ist die Wirkung eingeschränkt, so dass die endokrine Therapie häufig mit einer Ovariectomie kombiniert wird, um den Erfolg zu erhöhen. Zudem wird bei Frauen mit besonders hohem Erkrankungsrisiko (gehäuftes Auftreten in der

Familienanamnese) Tamoxifen® auch prophylaktisch eingesetzt, da die Nebenwirkungen vergleichsweise gering sind. Allerdings tritt bei einem nicht unerheblichen (40-50%) Teil der Patientinnen eine Resistenz gegenüber Tamoxifen® auf. Es wird eine primäre oder auch De-novo-Resistenz von einer sekundären oder auch erworbenen Resistenz unterschieden (Shou et al. 2004). Die primäre Form liegt bei Östrogenrezeptor-positiven (ER-positiven) Karzinomen vor, die sich schon bei der ersten Behandlung resistent zeigen. Bei der sekundären Form entwickelt sich nach einer Phase, in welcher der Tumor auf die Therapie gut anspricht, im Verlauf der weiteren Behandlung eine Resistenz. Diese Resistenzen können darauf beruhen, dass die Tumorzellen Coaktivatoren exprimieren, z. B. AIB1 (Osborne und Schiff 2003), die Rezeptoren mutiert sind oder eine veränderte Signaltransduktion, z. B. PAX2, vorliegt (Hurtado et al. 2008). Ein weiterer Östrogenrezeptor-Antagonist ist Toremifen®, welches mit Tamoxifen® eng verwandt ist und zur Therapie von metastasierten, Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen eingesetzt wird. Eine zweite Gruppe sind die Aromatasehemmer, welche den Enzymkomplex Aromatase blockieren und ihre Wirkung unabhängig vom Östrogenrezeptor entfalten. Aromatase kommt im Ovar, aber auch im Muskel und Fettgewebe vor. Außerdem findet man diesen Enzymkomplex auch im Tumorgewebe des Mammakarzinoms. Die Aromatase ist eines der Schlüsselenzyme in der Synthese des körpereigenen Östrogens. Bei den Aromatasehemmern unterscheidet man reversible und irreversible Hemmstoffe. Zu den reversiblen Aromatasehemmern gehört Aminoglutethimid. Dieses hemmt lediglich die Aromatase in den peripheren Geweben, ist hingegen nicht in der Lage, das ovarielle Enzym zu hemmen. Daher eignet sich ein Therapieeinsatz nur postmenopausal nach Versiegen der ovariellen Hormonproduktion oder nach durchgeführter Ovariectomie.

Neuere Therapieverfahren machen sich die Eigenschaft zu Nutze, dass Tumorzellen Defekte bestimmter Gene aufweisen, die von Vorteil für das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen sind. Zu den bekanntesten Genen zählt HER2/Neu. Da dieses membranständige Protein gut durch Medikamente erreicht wird, bietet sich der Rezeptor als optimales Ziel für eine sogenannte genspezifische Therapie an. Im Falle von HER2/Neu wird ein monoklonaler Antikörper (Trastuzumab; Herceptin®) eingesetzt. Herceptin® wurde 1998 von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und gilt als Paradigma für die neue Klasse der genspezifischen Therapeutika. Wird Herceptin® in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt, können zum Teil spektakuläre Erfolge

erzielt werden. Im Durchschnitt führt die Behandlung mit Herceptin® zu einer 5-monatigen Lebensverlängerung, selbst bei Patientinnen mit metastasiertem Karzinom (Stebbing et al. 2000). Zurzeit wird in klinischen Studien die Anwendbarkeit von Herceptin® auch bei der adjuvanten Therapie beim nicht-metastasierten Mammakarzinom untersucht (Gianni et al. 2011).

Zusammenfassend ergibt sich für die Behandlung des Mammakarzinoms ein breites Spektrum an therapeutischen Möglichkeiten. Entscheidend für die Auswahl eines Therapieregimes sind neben Alter der Patientin, Lokalbefund und Metastasierungsgrad molekulargenetische Klassifizierungen des Tumorgewebes. Dabei spielt die Bestimmung des Östrogen- bzw. Progesteron-Rezeptorstatus und die Detektion der Her2/Neu-Rezeptor-Expression beim Mammakarzinom eine entscheidende Rolle.

1.3 Genetik des Mammakarzinoms

1.3.1 Tumorentstehung

Tumorerkrankungen entstehen als Folge von genetischen Veränderungen (Mutationen) in einzelnen Zellen. Verschiedene Mutationsformen sind bekannt. Man unterscheidet auf DNA-Ebene Punktmutationen (Austausch einer Base gegen eine andere), Deletionen (Verlust einer oder mehrerer Basen), Insertionen (Einbau einer oder mehrerer Basen), Duplikationen (Verdoppelung eines Gens oder Sequenzen eines Gens), und Amplifikationen (Vermehrung eines Gens oder eines ganzen Genomabschnitts). Sind ganze Chromosomen oder Abschnitte von Chromosomen betroffen, so spricht man von Chromosomenaberrationen.

Die Ursachen von Genmutationen sind vielfältig. Sie können spontan entstehen. Die Mechanismen ihrer Entstehung gehen dann meist auf zelluläre Ereignisse oder Stoffwechselprozesse zurück (z. B. Fehler der DNA-Polymerase bei der DNA-Replikation, zufällige spontane Veränderungen in den Basen der DNA, die auf deren Instabilität beruhen oder Fehler beim crossing-over während der meiotischen Rekombination). Mutationen können allerdings auch durch Strahlung (ionisierende Strahlung oder UV-Strahlung) oder chemische Mutagene (z.B. Tabak, Ruß, Anilinfarben) induziert werden.

Diese genetischen Veränderungen können zur Tumorentstehung beitragen, tun dies aber nicht zwingend. Ihre Kanzerogenität hängt vor allem davon ab, auf welcher Ebene der DNA sie stattfinden. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Mutation phänotypisch auswirkt, höher, wenn sie ein Exon betrifft, als wenn sie innerhalb eines Introns liegt. Entscheidend ist auch, in welche Prozesse (z. B. Zellproliferation) das Genprodukt, für

welches das mutierte Gen kodiert, involviert ist. Inzwischen ist eine Vielzahl von Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, bekannt. Hierbei lassen sich Gene, die durch Mutation oder Fehlregulierung direkt an der malignen Transformation einer Zelle beteiligt sind (Onkogene) unterscheiden, von Genen, die durch den Verlust ihrer Funktion zur malignen Entartung beitragen (Tumorsuppressorgene). Onkogene sind beispielsweise das BCL2-Gen bei Lymphomen, das MYC-Gen beim Burkitt-Lymphom und auch eine Amplifikation des ERBB-2-Gens beim Mammakarzinom und bei Glioblastomen. Bekannte Tumorsuppressorgene sind p53 bei kolorektalen und anderen Karzinomen und das RB1-Gen beim Retinoblastom. Dennoch reicht eine einzige Mutation eines zellulären Gens meist nicht aus, um eine Zelle maligne entarten zu lassen. Da entartete Zellen mehrere Eigenschaften (z. B. substratunabhängiges und immortalisiertes Wachstum, fehlende Kontaktinhibition, fehlende Alterung der Zellen) besitzen müssen, um erfolgreich klonal expandieren zu können, müssen normalerweise mehrere Mutationen innerhalb eines Zellklons stattfinden. Dafür spricht auch, dass die Häufigkeitsgipfel vieler Tumoren im fortgeschrittenen Alter liegen. So werden Mutationen, die für die maligne Entartung eines Zellklons nötig sind, nach und nach über einen langen Zeitraum erworben. Diesen Prozess beschreibt das sogenannte Stufenmodell der Karzinogenese. Ein recht anschauliches Beispiel hierfür ist die Adenom-Karzinom-Sequenz bei der Entwicklung kolorektaler Karzinome. Diese beschreibt, dass die meisten kolorektalen Karzinome über Stufen genetischer Mutationen (z. B. eine Mutation im KRAS-Gen oder im APC-Gen) aus Adenomen, den sogenannten Darmpolypen, resultieren (Vogelstein et al. 1988).

Auch für das Entstehen des Mammakarzinoms wird ein ähnlicher Prozess angenommen. Arbeitsgruppen um Sjöblom (Sjöblom et al. 2006) und Wood (Wood et al. 2007) beschrieben im Durchschnitt 14 Mutationen, die beim Tumorgeschehen des Mammakarzinoms eine Rolle spielen. Interessanterweise ergab sich für jeden untersuchten Tumor (das Kollektiv wurde gebildet aus elf Mammakarzinomen und zwei normalen Referenzgeweben) eine individuelle Genkartierung, deren genaue Betrachtung zu gewissen Überschneidungen der Genmutationen beziehungsweise den Genprodukten führte. Eine Vielzahl der detektierten Gene kodierte für Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsproteine oder Signaltransduktionswege. Besonders häufig fanden sich beim Mammakarzinom Gene bzw. Genprodukte, die in Signalkaskaden unter Beteiligung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und von Nuklearem Faktor κ B (NF- κ B) eingreifen.

Neben diesen spontan entstandenen Mammakarzinomen mit zahlreichen, genetischen Veränderungen der Chromosomen existiert zudem eine erbliche Form mit erhöhter

Disposition für Mammakarzinome. Dieses sogenannte familiäre Mammakarzinom beobachtet man bei circa 5-10% aller Brustkrebspatientinnen. Es zeichnet sich durch ein besonders frühes Erkrankungsalter und durch einen häufig beidseitigen Befall der Mammæ aus. Zugrunde liegen diesem zwei Dispositionsgene; das BRCA1-Gen (englisch: breast cancer-1) mit seinem Genlokus auf dem Chromosom 17q21 und das BRCA2-Gen auf dem Chromosom 13q12-13. Beschrieben wurden diese von Miki (Miki et al. 1994) und Wooster (Wooster et al. 1995).

Hinsichtlich der Tumorgenese des Mammakarzinoms im Allgemeinen bestehen unterschiedliche Modelle: Bombonati veröffentlichte 2011 eine Zusammenfassung der gängigen Theorien (Bombonati und Sgroi 2011). Wellings postulierte 1973 das lineare Modell, welches, insbesondere beim Entstehen des duktales Karzinoms, einen mehrstufigen, linearen Prozess der Tumorgenese beschreibt (Wellings und Jensen 1973).

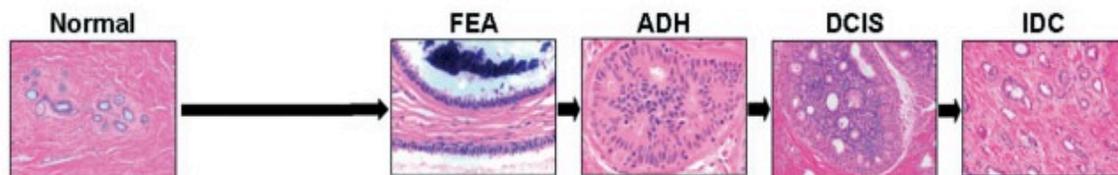


Abbildung 1: Modell der klassischen Tumorphyse (Abbildung modifiziert entnommen aus: Bombonati und Sgroi 2011). Gezeigt ist die Entstehungskaskade eines invasiv-duktales Karzinoms (IDC) ausgehend von der normalen epithelialen Zelle (Normal) über die flat epithelial Atypia (FEA), die atypical ductal Hyperplasia (ADH) und das duktales Carcinoma in situ (DCIS).

Ergänzt wurde dieses durch zwei weitere Modelle. Das Modell der klonalen Evolution besagt, dass eine Tumorzelle auf ihrem Weg von der normalen Zelle eine Vielzahl von Mutationen akkumuliert, welche ihr im Sinne der natürlichen Selektion einen Überlebensvorteil liefert und somit zur Tumorphyse führt. Der weitere Weg beschreibt einen Prozess der genetischen Instabilität und der unkontrollierten Proliferation, welcher neue Tumorzellen mit weiteren Mutationen und Eigenschaften generiert; ein Prozess, der als Tumorphyse bezeichnet wird. Angenommen wird, dass zum einen Subpopulationen entstehen, welche weitere Überlebensvorteile (z. B. Resistenz gegenüber Apoptose, Bereitschaft zur Invasivität und Metastasierung) entwickeln, zum anderen aber auch Subpopulationen aufkommen, die schwinden. So würde es zum Entstehen von tumoraler Heterogenität kommen. Diese könnte dann wiederum als Erklärungsansatz für das Entstehen einer Therapieresistenz, im Sinne eines Selektionsdruckes, oder eines Rezidivs nach Tumorfreiheit dienen.

Das zweite Modell wird als Tumor-Stammzell-Hypothese bezeichnet. Dieses beruht auf der Annahme, dass eine Tumor-Stammzelle aus einer Organ-ansässigen Stamm- oder Progenitorzelle entsteht. Somit besitzt diese Eigenschaften der Selbsterneuerung und kann im weiteren Prozess der Differenzierung unterschiedliche Tumorformen ausbilden. Ein kleiner Anteil eines Tumors besteht weiterhin aus diesen Tumor-Stammzellen. Zur Tumorprogression und Metastasierung käme es, wenn es zur Aussaat einer Tumor-Stammzelle kommt. Auch das Auftreten eines Rezidivs wäre darin begründet, dass die Tumor-Stammzelle möglicherweise von der Therapie unbeeinflusst bleibt. Wiederum müsste man von tumoraler Heterogenität hinsichtlich vieler Eigenschaften je nach weiterer Differenzierung der Tumor-Stammzelle ausgehen (Campbell und Polyak 2007).

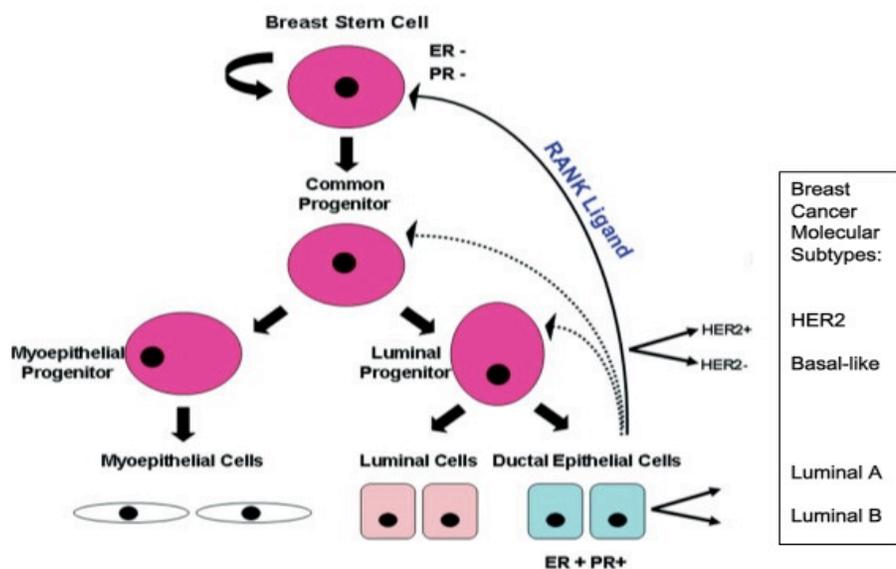


Abbildung 2: Modell der molekularenpathologischen Tumorprogression (Abbildung modifiziert entnommen aus: Bombonati und Sgroi 2011) Die Brust-Stammzelle (Breast Stem Cell) besitzt die Eigenschaft zur Selbsterneuerung (gebogener schwarzer Pfeil) und bildet eine gemeinsame Progenitorzelle (Common Progenitor) aus. Diese wiederum differenziert sich zu myoepithelialen bzw. luminalen Progenitorzellen (Myoepithelial/Luminal Progenitor). Als Endprodukt des Differenzierungsprozesses entstehen die unterschiedlichen Brustzelltypen: myoepitheliale (Myoepithelial Cells), luminal (Luminal Cells) und duktale (Ductal Epithelial Cells) Zellen. Der Differenzierungsprozess wird über parakrine Sekretion des RANK-Liganden von den differenzierten, Östrogen- und Progesteron-regulierten, dukталen Zellen gesteuert. Hinsichtlich der Karzinogenese mündet der Differenzierungsprozess in einer unten detailliert beschriebenen molekularenpathologischen Einteilung der unterschiedlichen Brustkrebsformen.

Interessanterweise orientieren sich die jüngsten Studienergebnisse an den molekularenpathologischen Subtypen des Mammakarzinoms und zeigen, dass die Tumorprogression in starkem Zusammenhang mit dem histologischen Grading steht

(Bombonati und Sgroi 2011). Letztendlich scheinen die Modelle der Tumorgenese und Progression zu überlappen und sollten im Zusammenspiel dem Verständnis der (molekular) pathologischen Grundlagen dienen. Die aktuelle Studienlage beschreibt frühe, genetische Alterationen, die sowohl in den Vorstufen (z. B. DCIS) als auch in den invasiven Karzinomen gefunden werden. In diesem Sinne ist eine Arbeit von Buerger, Otterbach und Simon insbesondere in Bezug auf duktale Karzinome und deren Vorstufen, zu bewerten. Auffälligkeiten hinsichtlich bestimmter DNA-Verluste bzw. -Zugewinne und hinsichtlich des histologischen Gradings konnten in Zusammenhang gebracht werden mit der Entwicklung eines DCIS in eine invasive Brustkrebsform. Die untersuchten Tumore wiesen einen hohen Grad an Übereinstimmung hinsichtlich des Differenzierungsgrades auf. So scheint ein Entwicklungspfad u. a. über einen Verlust von Chromosom 16q in gut bis mäßig differenzierte Vorstufen und Karzinome zu münden, während der alternative Pfad z. B. über einen Zugewinn von 11q13 über mäßig bis schlecht differenzierte präinvasive Läsionen in G2- bis G3-Karzinomen verläuft (Buerger et al. 1999).

1.3.2 Genetische Subtypen

Das Genexpressionsmuster, welches mit DNA-Microarrays aus dem Tumorgewebe bestimmt werden kann, lässt eine neue molekulare Tumorklassifikation zu (Carey et al. 2006). Es werden hier fünf verschiedene genetische Subtypen des Mammakarzinoms unterschieden:

- Hormonrezeptorpositive Tumoren mit geringer Aggressivität (Luminal-A, 62,5%),
- Hormonrezeptorpositive Tumoren mit höherer Aggressivität (Luminal-B, 18%),
- HER2-positive Tumoren (erbB2-Phänotyp, 9,9%) und
- Hormonrezeptor- und HER2-negative Karzinome mit Basalzell-Eigenschaften (basal, 8,4%),
- Hormonrezeptor- und HER2-negative Karzinome ohne Basalzell-Eigenschaften (normal, 1,4%). (Arrechea Irigoyen et al. 2011)

Diese Einteilung, die möglicherweise in Zukunft zunehmend prädiktive Aussagen hinsichtlich des Therapieansprechens (z. B. gegenüber einer endokrinen oder systemischen Chemotherapie), des Krankheitsverlaufs und der Prognose zulassen wird, ist aktuell Bestandteil vieler Studien.

1.3.3 Amplifikationen

Das Vorhandensein einer erhöhten Kopiezahl einzelner Gene oder ganzer Genomabschnitte bezeichnet man als Amplifikation. Dadurch sind DNA-Abschnitte häufiger als im normalen

diploiden Chromosomensatz repräsentiert und können zu einer starken Überexpression der zugehörigen Genprodukte führen. Beim Vorhandensein einer solchen Amplifikation eines Genomabschnittes, welcher beispielsweise für wachstumsregulierende Prozesse einer Zelle verantwortlich ist, kann der mutierten Zelle durch die Überexpression der Genprodukte (z. B. Wachstumsfaktoren, Hormonrezeptoren) ein Wachstums- bzw. Überlebensvorteil gegeben sein. Der molekulare Mechanismus, der diesen chromosomalen Instabilitäten zugrunde liegt, ist nicht vollständig bekannt. Die gängigste Theorie für das Entstehen mitotischer Abnormalitäten und spezifischer genomischer Rearrangements ist der sogenannte „Breakage Fusion Bridge“-Mechanismus (Narayanan und Lobachev 2007). Dieser beschreibt einen Reparaturmechanismus nach einem Strangbruch und dem Verlust eines Telomers während der Mitose durch die Fusion beider Schwesterchromatiden und dem erneuten Anbau der Telomerregion. So entstehen nach Abschluss der Mitose eine Tochterzelle mit amplifiziertem Genmaterial und eine Tochterzelle, die gekennzeichnet ist durch einen Verlust dieses Materials.

Gängige Methoden, um Amplifikationen auf genetischer Ebene zu detektieren, sind unter anderem die 1992 erstmals beschriebene, vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomische Hybridisierung, CGH) (Kallioniemi et al. 1992), die weiterentwickelte Array-CGH sowie die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung.

1.3.3.1 Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die zu untersuchende DNA wird gegen eine normale Referenz-DNA gemessen. Beide unterschiedlich Fluoreszenz-markierten DNAs werden auf Metaphase-Chromosomen hybridisiert, wo sie um Bindungsstellen an der DNA konkurrieren. Die Auswertung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch und orientiert sich an den verschiedenen fluoreszierenden Signalen zwischen der normalen Probe und derjenigen mit den DNA-Zugewinnen bzw. -Verlusten. Dabei stellt die konventionelle CGH ein rein qualitatives Verfahren dar. Ein Nachteil besteht im limitierten Auflösungsvermögen. DNA-Veränderungen, die kleiner als 5-10 MB sind, können nicht detektiert werden.

Die Array-CGH (aCGH) ist eine Weiterentwicklung der konventionellen CGH und bedient sich vorgefertigter Mikroarrays (Solinas-Toldo et al. 1997): als Targets dienen auf der Oberfläche eines Glasobjektträgers definierte DNA-Fragmente. Die Fragmente sind so ausgewählt, dass sie das menschliche Genom möglichst gleichmäßig repräsentieren. Für die Analyse werden etwa gleiche Mengen der Patienten- und einer genomischen Referenz-DNA auf dem Array hybridisiert. Da die DNA-Proben von Patient und Referenz mit

unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, führt eine numerische Veränderung im Patientengenom über eine Verschiebung im Hybridisierungsverhältnis zu einer Farbverschiebung des Fluoreszenzsignals einzelner Fragmente. Dieses Verfahren ist wesentlich hochauflösender als die konventionelle CGH. Es können Genomabschnitte mit bis zu <1 MB dargestellt werden.

1.3.3.2 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) wurde Anfang der 80er Jahre erstmals beschrieben (Langer-Safer et al. 1982) und gewann seitdem an Bedeutung. Hauptsächliche Einsatzgebiete sind heutzutage die prä- und postnatale Chromosomenanalyse sowie Anwendungen in der molekularen Pathologie, der Hämatologie und der Krebsforschung. Die FISH kann numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen an Metaphasechromosomen aus kultivierten Zellen sowie direkt an Interphasezellkernen und sogar in Gewebeproben, die über Jahrzehnte archiviert wurden, nachweisen. Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung basiert auf der Basenpaarung von markierten DNA-Sonden mit ihren komplementären DNA-Zielsequenzen. Sie läuft in mehreren Schritten ab; zunächst findet die Markierung entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder indirekt mit einem primär nichtfluoreszierenden Produkt statt. Anschließend wird die DNA aus ihrer doppelsträngigen Struktur gebracht, sie wird denaturiert. In weiteren Schritten wird die Sonden-DNA an der komplementären DNA hybridisiert und ein Überschuss an ungebundener DNA wird durch eine Waschung entfernt. Zur besseren Darstellung wird durch den Einsatz eines Komplementärfarbstoffes (zum Beispiel DAPI) die zelluläre DNA gegengefärbt. Direkt Fluoreszenz-markierte DNA gibt nun unter dem Einsatz eines entsprechenden Fluoreszenzmikroskopes deutliche Signale, während der Einsatz eines nichtfluoreszenzgekoppelten Reagens einen weiteren Arbeitsschritt benötigt. Die markierten DNA-Sonden müssen mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gekoppelt werden.

1.3.4 Her2/Neu-Amplifikation

Zu den wohl bekanntesten Amplifikationen zählt Her2/Neu, welches für einen Oberflächenwachstumsrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität kodiert. Das Her2/Neu-Gen liegt bei ca 20-30% der Mammakarzinome amplifiziert vor (Burandt und Sauter 2010). Das heißt, anstelle der „normalen“ zwei Genkopien können in amplifizierten Tumorzellen dutzende bis über hundert Genkopien vorliegen. Die Her2/Neu-Amplifikation führt zu einer massiv vermehrten Expression des Her2/Neu-Rezeptorproteins auf der Zelloberfläche. Die

Rezeptormoleküle werden durch Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen, eng verwandten Rezeptoren (Mitgliedern der sogenannten Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Familie: Her1, Her2 und Her4) aktiviert und führen so zu einem permanenten Wachstumsstimulus für die Tumorzellen. Weil der Her2/Neu-Rezeptor in normalem menschlichen Gewebe so gut wie nicht exprimiert wird, das Tumorstadium in starkem Maß vom Her2/Neu-Rezeptor abhängt, und weil Her2/Neu als membranständiges Protein gut durch Medikamente erreichbar ist, bietet sich der Rezeptor als optimales Ziel für eine sogenannte genspezifische Therapie an. Eine wichtige Ausnahme bildet der Herzmuskel, welcher ebenfalls Her2/Neu exprimiert. Somit erklärt sich die seltene Komplikation der Kardiomyopathie in Folge einer Therapie mit Herceptin®, die dann den Abbruch der Therapie erfordert (Singer et al. 2008). Erstaunlicherweise werden Her2/Neu-Amplifikationen nicht ausschließlich beim Mammakarzinom sondern auch bei Tumoren der Harnblase (Wang et al. 2007), der Gallenwege (Nakazawa et al. 2005) und des Ösophagus (Reichert et al. 2007) gefunden. Ob eine Herceptin®-Therapie auch bei diesen Tumoren wirksam ist, ist gegenwärtig Gegenstand laufender klinischer Studien.

1.3.5 Östrogenrezeptoren und ESR1-Amplifikation

Die Abhängigkeit vieler Mammakarzinome von weiblichen Geschlechtshormonen durch die Überexpression des Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors ist schon lange bekannt und wird seit gut 30 Jahren auch medikamentös genutzt (Adelson et al. 2011).

Der Östrogenrezeptor gehört zur Familie der Steroidrezeptoren und befindet sich im Zytoplasma (nicht auf der Zelloberfläche) der hormonabhängigen Zellen. Auf molekularer Ebene bindet Östrogen nach Passage der Zellmembran an diesen zytoplasmatischen Rezeptor, welcher durch die Ligandenbindung phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Aktivierte Rezeptormoleküle bilden Dimere und wandern in den Zellkern, wo sie ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren entfalten können. Dabei initiieren sie nach Bindung an die DNA die Expression bestimmter Gene, deren Genprodukte im Falle des Brustdrüsengewebes ein Wachstum der Brustdrüsenzellen verursachen. In menschlichen Geweben finden sich zwei unterschiedliche Östrogenrezeptoren (ER), welche jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden und in den verschiedenen Geweben durchaus unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen (Pfaffl et al. 2001). Diese werden als ER-alpha (Gen 6q25.1) und als ER-beta (Gen 14q22-q24) bezeichnet. Die beiden kodierenden Gene heißen ESR1 bzw. ESR2. Zunächst wurde im Jahr 1958 der Östrogenrezeptor ER-alpha beschrieben (Enmark und Gustafsson 1999). 1996 wurde (Kuiper et al. 1996) der

zweite Östrogenrezeptor ER-beta erstmalig isoliert. Beide Rezeptortypen zeigen biochemisch gewisse Ähnlichkeiten und weisen einen hohen Grad an Homologität im Aufbau der ligandenbindenden „activation function-2“ (AF-2) und der DNA-bindenden Domäne auf. Unterschiede zeigen sich in der Struktur der „activation function-1“- (AF-1) Domäne. Hierbei scheint die Aktivität von sogenannten „estrogen response elements“ bei ER-alpha viel größer zu sein als bei ER-beta (Cowley und Parker 1999). Während dem ER-alpha eine durch Östrogene stimulierte Proliferation der Zielgewebe zugeschrieben wird, ist über die Funktion und klinische Relevanz des ER-beta wenig bekannt. Es wird angenommen, dass ER-beta in seiner Funktion der des ER-alpha entgegenwirkt und somit zu einer Reduktion der proliferationsfördernden Stimuli führt (Omoto et al. 2003).

Im Falle des ESR1-Gens konnte mehrfach gezeigt werden, dass dieses in bis zu 20% der Mammakarzinome amplifiziert vorliegt (Holst et al. 2007, Tomita et al. 2009).

1.4 Metastasierung

Die Invasivität und die Fähigkeit, Metastasen auszubilden, ist ein wesentliches Merkmal maligner Tumore. Hierbei dringen Tumorzellen in einem mehrstufigen Prozess zunächst in das benachbarte Gewebe ein, was mit einer Zerstörung (Destruktion) der normalen Gewebestruktur einhergeht. Dieser Vorgang wird als Invasion bezeichnet und lässt sich in drei Phasen gliedern: Der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, dem enzymatischen Umbau und der aktiven Bewegung der Tumorzelle, auch als Lokomotion bezeichnet. Im Falle des Mammakarzinoms beschrieben Levental et al. eine Alteration der Integrin-Signalkaskade, welche es der Karzinomzelle ermöglicht über eine Veränderung der Kollagenvernetzungen die extrazelluläre Matrix zu modifizieren (Levental et al. 2009). Angenommen wird, dass in den meisten Karzinomtypen der Schritt der Invasion in einem kohäsiv-multizellulären Verband stattfindet; ein Prozess, der als kollektive Invasion bezeichnet wird. Denkbar ist auch eine Invasionskaskade einzelner Tumorzellen. Zwei Modelle werden hierbei unterschieden: Die mesenchymale Invasion ist abhängig von Interaktionen der Protease, Aktin- und Myosinfibrillen sowie von Intergrinen, wohingegen das Modell der amöboiden Invasion unabhängig ist von diesen Proteininteraktionen und über die Rho/ROCK-Kaskade abläuft (Friedl und Wolf 2003). Ergänzt wurde diese Einteilung von Thiery et al. durch die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition: Die Karzinomzelle verlässt durch Veränderungen des Proteinmusters den epithelialen Verband, indem sie mesenchymale Eigenschaften annimmt. Die Tumorzelle vermindert die Expression von E-Cadherin, welches für den Zellverband in Epithelien verantwortlich ist, und exprimiert mesenchymale

Transkriptionsfaktoren, wie ZEB1 und ZEB2. Vermittelt wird dieser Prozess durch miR-200 (Thiery et al. 2009). Angekommen im umgebenden Gewebe, muss sich die Tumorzelle mit einer Vielzahl von Stromazellen auseinandersetzen. Im Falle des Mammakarzinoms konnte gezeigt werden, dass gewisse Stromazellen für das Tumorwachstum stimulierende Botenstoffe aussenden; zum Beispiel IL-6 durch Adipozyten (Dirat et al. 2011).

Die eigentliche Metastasierung (griechisch: metastasis= Wegzug) im nächsten Schritt ist die Verschleppung von Tumorzellen des Primärtumors in andere Körperregionen mit Ausbildung einer Tochtergeschwulst (Metastase, Filia). Diese erfolgt nach einer Metastasierungskaskade. Zuerst dringt die Tumorzelle in den Metastasierungsweg ein, es kommt zur Intravasation. Dies geschieht wie bei der Invasion über ähnlich komplexe Prozesse. Involviert sind hier unter anderem Wachstumsfaktoren: Der Cytokin-transforming growth factor-beta, TGF β (Giampieri et al. 2009) und der Epidermal growth factor, EGF (Wyckoff et al. 2007). Darauf folgt die Verschleppung der Tumorzelle, die durch die anatomischen Strukturen in gewissem Maße vorgegeben ist. Anschliessend tritt die Zelle aus dem Metastasierungsweg aus. Es findet die sogenannte Extravasation statt. Während dieser Vorgänge muss sich die Tumorzelle mit vielen Immunreaktionen auseinandersetzen. Der Großteil der Tumorzellen überlebt den Weg der Metastasierung nicht. Die Verschleppung kann lymphogen, hämatogen oder kavitär erfolgen. Bei der lymphogenen Metastasierung kommt es zur Tumorausbreitung über die Lymphwege mit Tumorsiedlung in den Lymphknoten und Lymphbahnen. In den Lymphknoten führt das Tumorwachstum zur Verdrängung und Infiltration des lymphatischen Gewebes; es kommt zu einer tumorösen Vergrößerung. Dabei können Lymphknotenstationen hintereinander befallen sein, es ist aber auch möglich, dass einzelne Stationen übersprungen werden. Schließlich finden Tumorzellen über den Ductus thoracicus Anschluss an den Blutkreislauf. Bei der hämatogenen Metastasierung kommt es zum Eintritt der Tumorzellen ins Blutssystem durch die direkte Intravasation von maligne entarteten Zellen in Kapillaren und kleine Venen. Im Blutkreislauf angekommen, wird die Zelle mit der Blutzirkulation transportiert. Die Tumorzelle, auf ihrem Weg durch die Blutbahn als zirkulierende Tumorzelle (Nagrath et al. 2007) bezeichnet, muss sich erneut mit Immunprozessen, Scherkräften uvm. auseinandersetzen. Ein wesentlicher Schutzmechanismus scheint hierbei die Ausbildung eines ummantelnden Thrombus zu sein. Ein Prozess, der durch die Expression von Tissue Factor in Interaktion mit Thrombozyten stattfindet (Joyce und Pollard 2009). Durch Haftung der Zelle am Endothel kommt es zur Arretierung und anschließend zur Extravasation. Ein Prozess, der bei Mammakarzinomzellen am Beispiel

der pulmonalen Filialisierung untersucht wurde. Hier scheint die Expression von Metadherin die Bindung an pulmonale Blutgefäße zu ermöglichen (Brown und Ruoslahti 2004). Dabei penetriert die Tumorzelle den Kapillarfilter und emigriert aus dem Gefäßsystem. Zunächst ging man davon aus, dass diese Kaskade Ähnlichkeiten mit der Intravasation aufweist. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der anderen Körpergewebe fehlen hier jedoch die zur Intravasation am Ort des Primärtumors ansässigen Zellen und das entsprechende Mikromilieu. Beispielsweise fehlen im Falle des Mammakarzinoms die an der Intravasation beteiligten Tumor-assoziierten Makrophagen in anderen Körperregionen. Gupta et al. beschrieben erneut anhand der pulmonalen Filialisierung ein spezielles Genexpressionsmuster, u. a. unter Beteiligung von Angiopoietin-like-4, welches die pulmonale Gefäßwand hyperpermeabel und somit penetrierbar für die Tumorzelle machte (Gupta et al. 2007). Interessanterweise konnten Tumorzellen mit eben diesem Genexpressionsmuster die Extravasation in Blutgefäßen des Knochens nicht bewältigen (Padua et al. 2008). Es ist davon auszugehen, dass jedes Zielgewebe, bzw. dessen Blutgefäße, über einen individuellen Mechanismus penetriert wird. Somit ist der Weg zur Bildung von Tochtergeschwulsten in anderen Körperregionen geebnet. Dort angekommen, muss sich die Tumorzelle (dann auch als Mikrometastase bezeichnet) mit den neuen Gegebenheiten des Gewebes auseinandersetzen und muss sich diesen anpassen, bzw. passt das Mikromilieu des fremden Gewebes durch Aussendung bestimmter Signale durch den Primärtumor, u. a. Lysyl Oxidase (Erlor et al. 2009), den zur Absiedlung notwendigen Bedingungen an. Anschließend beginnt sie mit der Proliferation und somit der Ausbildung einer klinisch detektierbaren Metastase, der sogenannten Makrometastase. Ein Prozess, den Fidler als metastatische Kolonisation bezeichnet (Fidler 2003). Auch dieser unterliegt äußerst komplexen Gegebenheiten. Bereits Paget entdeckte vor 120 Jahren, dass unterschiedliche Tumorarten bestimmte Zielgewebe zur Metastasierung bevorzugen. Er formulierte die Seed-and-Soil-Hypothese (Valastyan und Weinberg 2011). Aus heutiger Sicht ist deutlich, dass für diese revolutionäre Beobachtung wahrscheinlich für jedes Zielgewebe individuell gültige, molekularpathologische Prozesse eine Rolle spielen. Beim Mammakarzinom sind bereits einige der verantwortlichen Gene zur Ausbildung von Filiae im Knochen (Kang et al. 2003), der Lunge (Minn et al. 2005), dem Gehirn (Bos et al. 2009) und der Leber (Tabariès et al. 2011) bekannt.

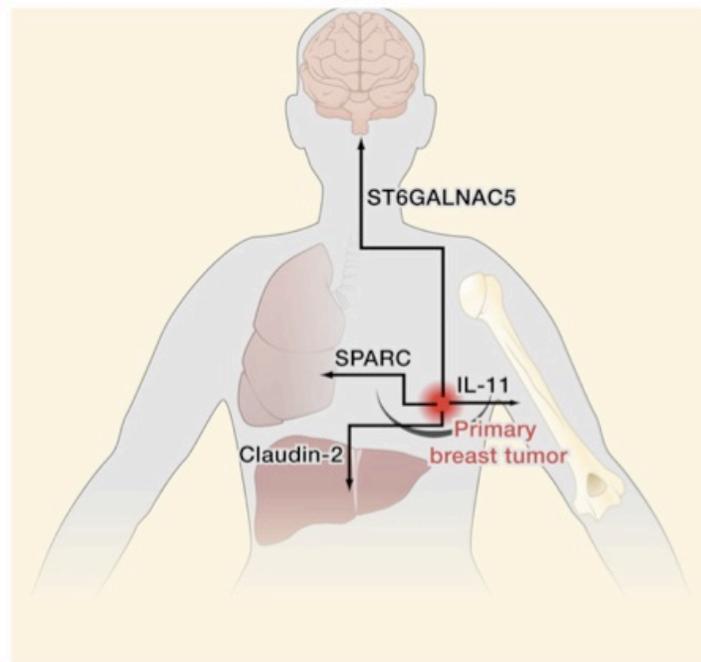


Abbildung 3: Verantwortliche Genprodukte für die Ausbildung von Fernmetastasen beim Mammakarzinom (Abbildung modifiziert entnommen aus: Valastyan und Weinberg 2011).

Die Metastasierung beim Mammakarzinom erfolgt häufig schon recht früh, sodass bei Diagnosestellung der Tumor schon gestreut hat. Das Mammakarzinom streut lymphogen, wie auch hämatogen. Bei der lymphogenen Metastasierung sind vor allem die Lymphknotenstationen entlang der Vena axillaris betroffen. Die Lymphknoten der Axilla werden dabei in drei Etagen eingeteilt. Eine erste Etage im unteren Abschnitt der Axilla beinhaltet die Lymphknoten lateral des Musculus pectorales minor. In der zweiten Etage, der mittleren Axilla, liegen die Lymphknoten zwischen dem lateralen und medialen Rand des Musculus pectorales minor. Ebenfalls gehören die intrapectoralen Lymphknoten zur mittleren Axilla. Zur dritten Etage, der oberen Axilla, zählen die Lymphknoten medial des Musculus pectorales minor.

Hämatogen streut das Mammakarzinom am häufigsten ins Skelettsystem (70%), in die Lunge (60%) und in die Leber (50%).

1.5 Ziel der Studie

In einer 2007 durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass auch das Gen für den Östrogenrezeptor-alpha (ESR1) in etwa 20% aller Mammakarzinome amplifiziert vorliegt, und dass Tumore mit ESR1-Amplifikation besonders gut auf die Therapie mit Tamoxifen® ansprechen (Holst et al. 2007). Des Weiteren zeigten auch benigne und präinvasive Läsionen ESR1-Amplifikationen. Papillome wiesen in 36%, duktales Hyperplasien in 8%,

DCIS in 35% und LCIS in 33% eine Amplifikation auf. Das Auftreten dieser genetischen Alteration auch bei den Mammakarzinomvorstufen lässt vermuten, dass das ESR1-Gen und dessen Produkt, der Östrogenrezeptor- α , eine Schlüsselfunktion in der Tumorgenese und dessen Progression hat. Ferner scheint diese Amplifikation ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentstehungskaskade des Mammakarzinoms zu sein.

In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass etwa 10% der Patientinnen trotz anfänglich gutem Ansprechen auf die Tamoxifen®therapie innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung ein Rezidiv erleiden (Forbes et al. 2008). Es wäre durchaus denkbar, dass der ESR1-Amplifikationsstatus einen Einfluss auf die Entwicklung einer Resistenz haben könnte.

Eine mögliche Hypothese wäre, dass die Amplifikation nicht in allen Tumorzellen vorliegt, sondern heterogen in verschiedenen Subklonen eines Tumors verteilt vorkommt. In diesem Fall könnten auch die Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen einen unterschiedlichen ESR1-Status aufweisen, je nachdem ob die Metastase von einem ESR1-amplifizierten oder einem nicht-amplifizierten Klon ausgegangen ist oder beides zugleich auftritt. Im Falle einer solchen Heterogenität könnten zwar die ESR1-amplifizierten Metastasen gut auf die Therapie ansprechen, die Amplifikations-negativen Metastasen jedoch nicht, wodurch sie früher oder später zu einem Rezidiv führen würden.

Möglicherweise könnte auch ein Verlust der ESR1-Amplifikation verantwortlich für die Resistenzentwicklung gegenüber einer antihormonellen Therapie sein.

Die Komplexität der Tumorgenese, Progression und Metastasierung aus heutiger Sicht mit den oben vorgestellten, molekulargenetischen Grundlagen verdeutlicht, dass hypothetisch viele Möglichkeiten genetischer Instabilitäten hinsichtlich eines Zugewinns oder aber auch eines Verlustes an DNA zwischen Primärtumoren und deren Metastasen, aber auch innerhalb eines Primärtumors oder zwischen den Metastasen denkbar sind.

Insbesondere da die systemische Therapie, zumeist nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors, auf die in der Diagnostik nicht untersuchten Metastasen abzielt, wäre ein Wandel hinsichtlich des ESR1-/ER-Status fatal.

Ziel unserer Studie war es deshalb, den ESR1-Amplifikationsstatus im Primärtumor mit demjenigen der Fernmetastasen und innerhalb der einzelnen Tumorgewebe zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tissue Micro Array (TMA)-Herstellung

Durch das Tumor-Array-Verfahren können bis zu tausend verschiedene Gewebeprobe in Form von Gewebezylindern mit einem Durchmesser von 0,6 mm in einem einzigen Paraffinblock und somit auf einem Objektträger untergebracht und anschließend untersucht werden. Dabei wird von jeder Gewebeprobe mit Hilfe eines H&E-gefärbten Schnittes eine histologisch definierte Region des Tumorgewebes bestimmt, die später das Donorgewebe für den Tissue Micro Array darstellt. Die Gewebezylinder werden mit einem Array-Stanzgerät gewonnen, welches zwei an der Spitze geschärfte Hohlzylinder aufweist. Dabei wird die kleinere der beiden Nadeln mit einem äußeren Durchmesser von 0,6 mm dazu verwendet Löcher in die 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblöcke zu stanzen, wohingegen die größere der beiden Nadeln mit einem inneren Durchmesser von 0,6 mm dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus „Donor-Blöcken“ und dem Einbringen dieser Zylinder in den Empfänger-Paraffinblock dient. So entspricht der innere Durchmesser dieser zweiten Nadel dem äußeren Durchmesser der dünneren Nadel und gewährleistet somit, dass der ausgestanzte Gewebezylinder genau in das vorgefertigte Loch im Empfänger-Paraffinblock passt. Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock.

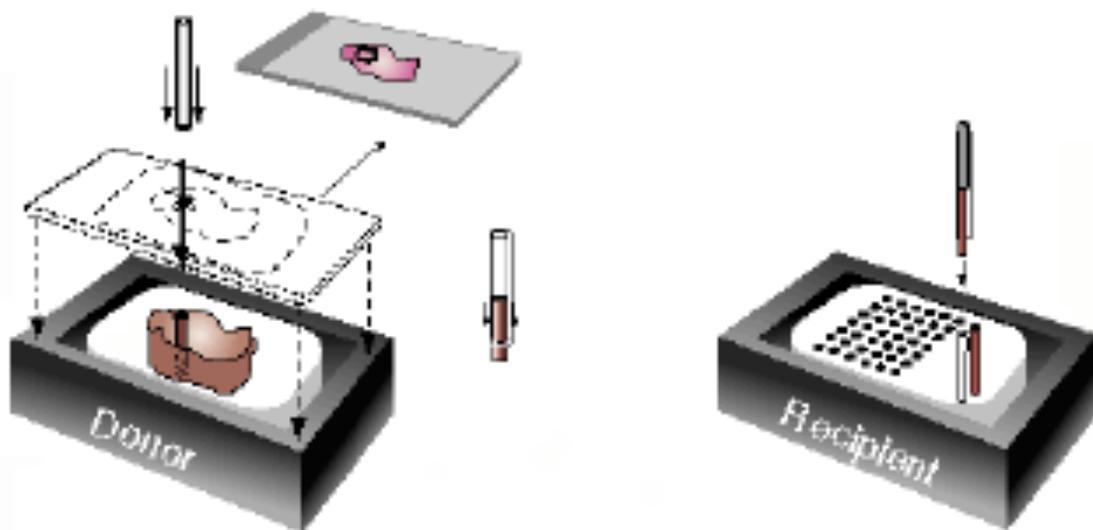


Abbildung 4: Gewinnung der auf dem Tissue Micro Array aufgebrachten Gewebezylinder aus dem „Donor-Gewebe“ mit einem Array-Stanzgerät und Einbringung in den Empfänger-Paraffinblock (Recipient).

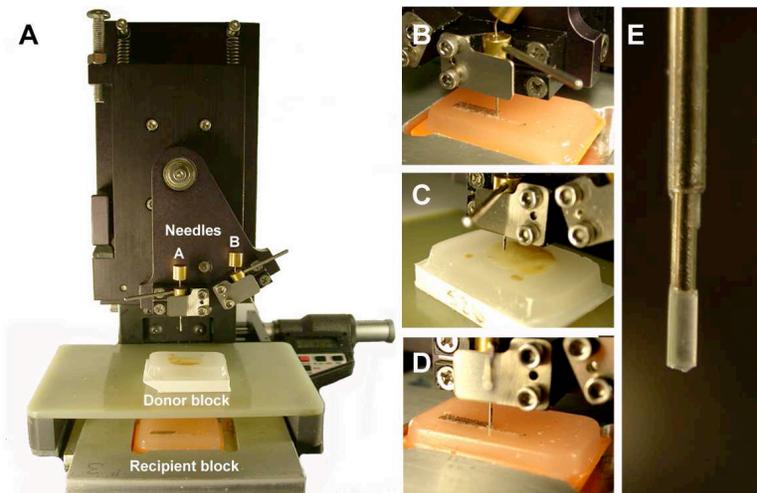


Abbildung 5: Konstruktion eines Tissue Micro Array. Mit Hilfe eines speziellen Gerätes (Arrayer, Stanzgerät A) werden mit einer Hohlnadel Gewebezylinder (0,6 mm Durchmesser) aus einem Gewebeblock (Donor block) (Autopsiematerial der Mammakarzinompatientinnen, Pathologie des Kantonsspitals Basel) entfernt. Die Abbildungen B-D zeigen, wie die Gewebezylinder in einen leeren Paraffinblock (Recipient block) eingebracht werden.

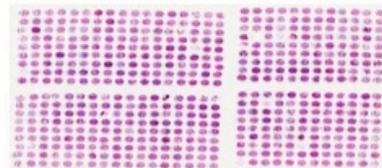


Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnitt eines Tissue Micro Arrays. Der Durchmesser eines einzelnen Gewebezylinders beträgt 0,6 mm.

2.2 Mammakarzinom-Fernmetastasen-Array

In einem ersten Schritt bei der Herstellung des Tissue Micro Arrays bestimmten wir mit Hilfe eines H&E-gefärbten Schnittes eine definierte Region des Tumorgewebes und entnahmen aus diesem „Donor-Gewebe“ einen 0,6 mm durchmessenden Gewebezylinder und brachten diesen auf einen Empfänger-Paraffinblock auf. So entstand ein TMA mit insgesamt 815 Gewebeproben von 815 unterschiedlichen Tumorgeweben. Da jedem „Donor-Gewebe“ vier Gewebezylinder entnommen wurden, ergaben sich letztendlich vier verschiedene TMAs, die in gleicher Anordnung Gewebeproben der jeweiligen „Donor-Gewebe“ aufwiesen. Somit untersuchten wir insgesamt 3260 (815 x 4) Gewebezylinder in der sich anschließenden Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung.

Dabei wurden 160 Patientinnen für diese Studie aus insgesamt 12.000 Autopsien, durchgeführt am Kantonsspital Basel zwischen 1982 und 2004, nach folgenden Auswahlkriterien ausgesucht:

- metastasierendes Mammakarzinom,
- Zeitraum zwischen Eintritt des Todes und der Autopsie < 24 Stunden.

Von diesen 160 Patientinnen wiesen neun eine, 22 zwei, 26 drei, 18 vier, 20 fünf und 65 mehr als fünf hämatogene Metastasen auf. Im Durchschnitt ergaben sich fünf hämatogene Metastasen pro Patientin. Die meisten Metastasen stammten aus der Lunge (n=106), der Leber (n=95) und aus dem Knochenmark (n=87). Gewebeblöcke von den dazugehörigen Primärtumoren der Mamma waren in 58 Fällen der insgesamt 160 Patientinnen verfügbar und wurden in die Studie mit einbezogen. Alle Gewebeproben waren Formalin-fixiert (4% gepufferte wässrige Lösung). Für die Weiterverarbeitung wurden von jedem Donor-Gewebe (Primärtumor bzw. Metastase) vier Gewebezylinder aus unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb des Tumorgewebes entnommen und auf einen Tissue Micro Array (TMA) aufgebracht, sodass sich für die Analyse insgesamt vier in der Anordnung der Gewebezylinder identische TMA-Replikate ergaben. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3 dargestellt. Wir gingen so vor, um nicht nur potentielle Unterschiede zwischen den jeweiligen Tumorgeweben (Heterogenität zwischen unterschiedlichem Tumorgewebe), sondern auch innerhalb eines jeden Tumorgewebes (Heterogenität innerhalb eines Tumorgewebes) untersuchen zu können. Die Zusammensetzung der TMAs ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Metastasen-TMA.

Gewebetyp	Anzahl Gewebeproben			
	TMA #1	TMA #2	TMA #3	TMA #4
Primärtumor	58	58	58	58
Metastasen	757	757	757	757
total	815	815	815	815

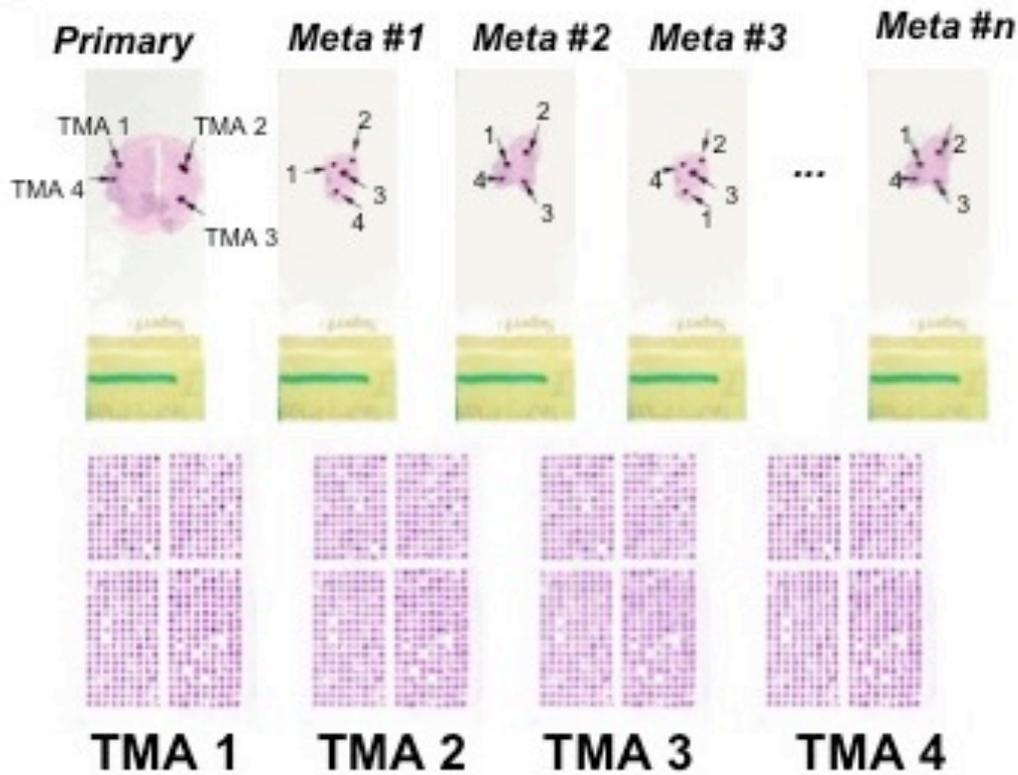


Abbildung 7: Schematische Darstellung des TMA-Aufbaus. Jedem Tumorgewebe (Primary: Primärtumor, Meta 1 bis n: Metastase 1 bis n) werden vier Proben entnommen und in gleicher Reihenfolge auf die TMA-Schnitte eins bis vier aufgebracht. Es entstehen vier Replikatarrays.

2.3 FISH-Analyse

Für die zweifarbige FISH-Analyse (ESR1-Signal: grün, Zentromer 6-Signal: orange) wurden 4 µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Abbott, Illinois, USA). Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (BAC RP-11450E24, RZPD, Deutschland), welche das ESR1-Gen umfasst, verwendet. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum Orange, Vysis/Abbott, Illinois, USA) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen/Life Technologies, New York, USA) durchgeführt. Die Hybridisierung sowie die nachfolgenden Waschprozeduren erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers, mit den von der Firma erhältlichen Reagenzien. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte geschah mit dem

„Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche, Basel, Schweiz). Die Schnittpräparate wurden danach mit 0,2mM 4'5-Diamino-2-Phenylindol (DAPI, Invitrogen/Life Technologies, New York, USA) gegengefärbt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH dargestellt. Diese umfassen:

- FISH-Sondenherstellung (pBac-E. coli-Klon-Kultivierung, DNA-Extraktion aus der E. coli-Kultur, DNA-Markierung mittels Nick-Translation)
- Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- Hybridisierung
- Waschung
- Detektion
- Auszählung der Gensignale mit einem Fluoreszenzmikroskop

2.3.1 FISH-Sondenherstellung

2.3.1.1 DNA-Gewinnung

Verwendete Materialien:

- pBac-E.coli-Klon: RZPD-Nr.: RP-11450E24 (C122127D6); stab-Stock-Kultur
- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (LB-Medium) (25g/l dH₂O); autoklaviert
- Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol absolut)

Laborprotokoll: pBac-E.coli-Klon-Kultivierung

- a) 10 ml LB-Medium in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben füllen
- b) Zugabe von 30 µl Chloramphenicol
- c) Mit abgeflamelter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und Abstrich aus der stab-stock-Kultur (RZPD-Nr.: RP-11450E24 (C122127D6)) machen
- d) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- e) Inkubation der beimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttelinkubator für 48 Stunden
- f) Umimpfen von 10 µl der gewonnenen Kultur in einen mit 10 ml LB-Medium gefüllten 100 ml-Erlenmeyerkolben, erneute Zugabe von 30 µl Chloramphenicol
- g) Inkubation der beimpften Kultur bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator über 12 Stunden

2.3.1.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mit Hilfe des „QIAprep Spin

Miniprep Kit“ (Qiagen, Kalifornien, USA) nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep Spin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten. Der DNA-Gehalt sowie der DNA-Reinheitsgrad der gewonnenen pBac.-E. coli-Klone wurden mit einem Nanodrop®-Photometer gemessen. Hierbei wurden zur Weiterverarbeitung nur Proben der pBac-E.coli-Flüssigkultur verwendet, die mindestens einen DNA-Gehalt von 30 ng/µl und einen Reinheitsgrad von wenigstens 1,90 aufwiesen.

Verwendete Materialien:

- pBac-E.coli-Flüssigkultur (RZPD-Nr.: RP-11450E24 (C122127D6))
- „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (inklusive aller Reagenzien und der „QIAprep Spin-Säulen“)

Laborprotokoll (modifiziert): DNA-Extraktion aus pBac-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- 2 ml der Flüssigkultur im 2 ml-Tube in einer Tischzentrifuge ($\sim 17.900 \times g$) für 120 sec bei 13.000 rpm pelletieren
- Erneute Zugabe von 1 ml der Flüssigkultur, Wiederholung der Zentrifugation
- Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- Zugabe von 250 µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4 bis 6-maliges Invertieren
- Zügige Zugabe (nicht länger als 5 Minuten) von 350 µl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4 bis 6-maliges Invertieren
- 10 Minuten zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- Überstand in eine „QIAprep Spin-Säule“ überführen
- 1 Minute Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- Durchfluss verwerfen
- „QIAprep Spin-Säule“ mit 500 µl Puffer PE beladen und 1 Minute zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- Durchfluss verwerfen
- „QIAprep Spin-Säule“ erneut mit 500 µl Puffer PE beladen und 1 Minute zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- Durchfluss verwerfen
- „QIAprep Spin-Säule“ erneut 1 Minute bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- „QIAprep Spin-Säule“ in ein 1,5 ml-Tube setzen
- „QIAprep Spin-Säule“ mit 50 µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen
- 1 Minute inkubieren (bei Raumtemperatur)

- r) 1 Minute zentrifugieren bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- s) Aufbewahrung im 1,5 ml-Tube bei 4°C

2.3.1.3 DIG-Nick-Translation zur FISH-Sondenherstellung

Die DIG-Nick-Translation ist eine Methode zum gleichmäßigen Einbau markierter Nucleotide in den DNA-Doppelstrang, wobei die DNA gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt wird. Diese kann durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden.

Verwendete Materialien:

- „Nick Translation System“ (Invitrogen)
- Digoxigenin 11-dUTP (Roche)
- Polymerase I (Invitrogen)

Laborprotokoll (modifiziert): DIG-Nick-Translation zur FISH-Sondenherstellung

Pipettierschema für ein 0,5 ml-Tube:

- 5 µl dNTP-Mix ohne dTTP
 - 1 µl Digoxigenin 11-dUTP
 - 38 µl pBac-DNA-Lösung
 - 5 µl Pol I-DNase-Mix
 - 1 µl Polymerase I
- a) Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren
 - b) Inkubation für 90 Minuten bei 15°C im Thermocycler
 - c) Zugabe von weiteren 5 µl Pol I-DNase-Mix; mit der Pipette durchmischen
 - d) Inkubation für 15 Minuten bei 15°C im Thermocycler
 - e) Zugabe von 5 µl Stop Buffer
 - f) Vortexen und danach herunterzentrifugieren
 - g) Lagerung bei 4°C

2.3.1.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten, genspezifische Sonde (6q25.1; RZPD Nr. RP-11450E24) und einer kommerziellen Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum Orange, Vysis/Abbott, Illinois, USA) durchgeführt. Dabei wurde die kommerzielle Zentromersonde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen und repetitiver DNA-Sequenzen) und

einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10 min bei 72°C codenaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Abbott, Illinois, USA) durchgeführt.

Verwendete Materialien:

- 2×SSC
- 20×SSC
- Cot-DNA
- Dextransulfat
- Enhancer Detection Kit (Roche, Basel, Schweiz)
- Ethanol
- Formamid (deionisiert)
- Hybrite (Abbott, Illinois, USA)
- NP40
- Tween 20
- Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung

- a) TMA-Schnitte 3 ×10 Minuten in Xylol stellen
- b) 2 × 5 Minuten in Ethanol (95%) stellen
- c) 3 Minuten auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
- d) 15 Minuten in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
- e) 2 Minuten in dH₂O waschen
- f) 150 Minuten in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
- g) 2 Minuten in dH₂O waschen
- h) 3 Minuten in Ethanol (70%) stellen
- i) 3 Minuten in Ethanol (80%) stellen
- j) 3 Minuten in Ethanol (95%) stellen
- k) 3 Minuten auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix (Master Mix 1.0)

- a) 5 ml deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20×SSC und 1 g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben

- b) bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- c) Suspension mit HCl auf pH 7 einstellen
- d) mit dH₂O auf 7 ml auffüllen
- e) bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (20µl)

- 14 µl Basis-Hybridisierungsmix (siehe oben)
- 2 µl Cot-DNA
- 4 µl Sonden-DNA

Laborprotokoll: Hybridisierung

- a) Hybridisierungsmix auf den TMA geben
- b) mit 24 × 32 mm Deckgläschen eindeckeln
- c) mit RubbERCement versiegeln
- d) bei 75°C für 10 Minuten im Hybrite denaturieren und dann über 12 Stunden bei 37°C im Hybrite inkubieren

2.3.1.5 Waschung

Im Anschluss an die Hybridisierung über 12 Stunden wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Laborprotokoll Waschung:

- a) TMA-Schnitte aus dem Hybrite entnehmen und RubbERCement und Deckgläschen entfernen
- b) Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- c) Schnitte 2 Minuten bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- d) Schnitte kurz in dH₂O waschen
- e) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

2.3.1.6 Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbst hergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiäranantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ (Roche, Basel, Schweiz) eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200, Vector) und einem 24 × 32mm Deckgläschen eingedeckt.

2.3.2 Auswertung

Die Auszählung der Gensignale erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss Axioskop Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop) mit entsprechenden Filtern innerhalb der ersten zwölf Stunden nach erfolgreicher Hybridisierung der Tissue Micro Arrays. Jede einzelne Gewebeprobe wurde hierbei zuerst in 10-facher Vergrößerung durchgeschaut. Anschließend erfolgte in 100-facher Vergrößerung die genaue Auszählung der Gen- und Zentromersignale. Hierfür wurden pro Gewebestück circa 20 Zellkerne berücksichtigt. Es wurde dann ein Durchschnittswert für die ermittelten Signale erhoben. Gewebeproben, die entweder in der Hybridisierung nicht markiert worden waren oder auf denen kein oder zu wenig Gewebematerial vorhanden war, wurden selbstverständlich nicht in die Auswertung mit einbezogen und als nicht analysierbare Proben klassifiziert. Aus den ermittelten Rohdaten wurde zur weiteren Verarbeitung und Klassifizierung der Gewebeproben eine Ratio aus der Genkopiezahl der ESR1-Signale und der Anzahl der Zentromer 6-Signale gebildet. Eine Ratio ≥ 2 , das heißt, es lagen mindestens doppelt so viele ESR1-Signale wie Zentromer 6-Signale vor, wurde als amplifiziert klassifiziert. Eine Gewebeprobe, die rechnerisch eine Ratio < 2 erbrachte, wurde als nicht amplifiziert bzw. als normal bezeichnet. Beispiele von Tumoren mit und ohne ESR1-Amplifikation sind in Abbildung 8 dargestellt.

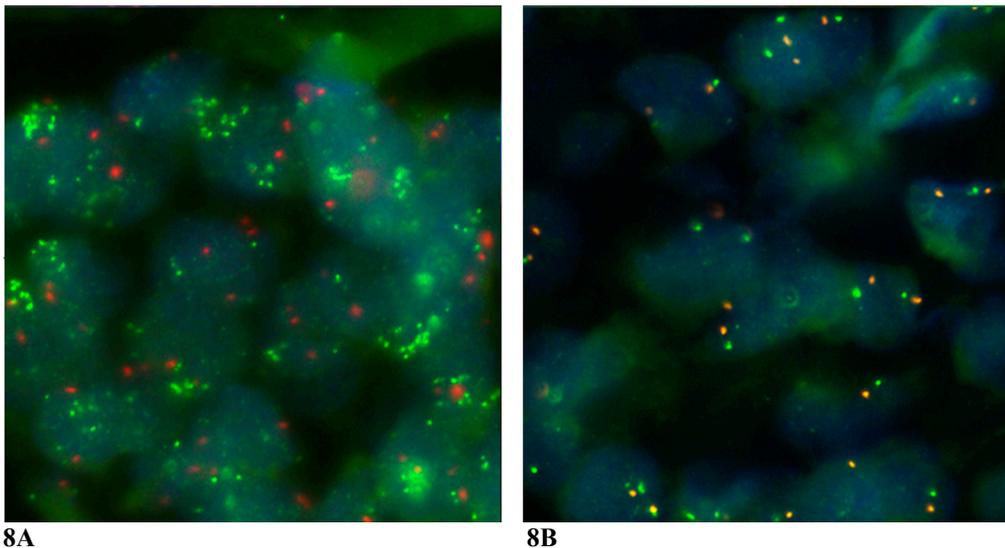


Abbildung 8: ESR1-/Zentromer 6-Resultate der FISH-Untersuchung. 8A: ESR1-amplifizierte Tumorzelle mit einer erhöhten Genkopiezahl des ESR1 und einer ESR1/Zentromer-Ratio > 2 . 8B: normale Kopiezahl des ESR1-Gens und des Zentromers 6 mit einer ESR1/Zentromer-Ratio = 1.

Die grünen Signale markieren die ESR1-Gensequenz, die orangefarbenen das Zentromer 6. Die Zellkerne wurden nach der Hybridisierung mit DAPI gegengefärbt und erscheinen dunkelblau.

2.4 Immunhistochemie (IHC)

Um das Östrogenrezeptor(ER)- α -Protein immunhistochemisch zu detektieren wurde der Antikörper NCL-L-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK) verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert und für zwölf Minuten bei 120°C unter Druck in einem pH6-Citratpuffer (Retrievit #BS-1006-00, BioGenex, Kalifornien, USA) inkubiert. Nach Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte im verdünnten (1:1000) Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Um die Antikörperbindung nachzuweisen wurde das „Vectastain ABC Elite Kit“ (Vectastain, Kalifornien, USA) benutzt. Der Grad der Positivität der IHC-Färbung wurde nach Allred eingeteilt. Die ER-Färbung wurde in eine Skala von vier Intensitäten (0-3), welche den Intensity Score (IS) ergab, unterteilt, der Anteil an positiven Tumorzellen wurde in fünf Stufen (0-5), den sogenannten Proportion Score (PS), unterteilt. Einzelheiten sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die Kombination beider Parameter resultierte im Total Score (TS), einer 8-Punkte-Skala, wobei alle Proben mit einer Punktzahl über zwei als ER-positiv gewertet wurden.

Die Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie wurde von Prof. Dr. med. Guido Sauter, Chefarzt und Leiter des pathologischen Institutes, vorgenommen. Die Resultate stellte er mir freundlicherweise für den Vergleich mit der durchgeführten FISH-Untersuchung zur Verfügung.

Tabelle 2: Der Allred-Score, eine Punkteskala von 0 bis 8 ist die Summe aus dem Proportion Score und dem Intensity Score.

Stainig Score % (=Proportion Score)	Anteil der positiv eingefärbten Zellen	Intensity Score	Durchschnittliche Intensität der positiv eingefärbten Zellen
0	keine	0	keine
1	<1/100	1	schwach
2	1/100 bis 1/10	2	mittel
3	1/10 bis 1/3	3	stark
4	1/3 bis 2/3		
5	>2/3		

2.5 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen der ESR1-Genamplifikation und der ER-Expression darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie versus FISH

Um die Beziehung zwischen der ESR1-Amplifikation auf genetischer Ebene und dem ER-Status auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden die FISH-Resultate aller untersuchten Gewebeprobe(n) ($n= 4 \times 815= 3260$) mit denen der IHC verglichen. Die IHC lieferte in 74,8% (2437/3260) ein interpretierbares Ergebnis, wohingegen die FISH-Analyse nur in 44,4% (1449/3260) erfolgreich war. In 823 Fällen fehlte das zu untersuchende Gewebe entweder ganz oder lieferte zu wenig Material, d. h. zu wenige Tumorzellen für die Untersuchungen, sodass in beiden Analyseverfahren diese Gewebeprobe(n) kein Ergebnis erbrachten. Fehler während der Hybridisierung ergaben zu schwache Gen-Signale oder zu starke Hintergrund-Signale, sodass weitere 988 Gewebeprobe(n) in der FISH-Analyse nicht auswertbar waren. Ein Beispiel für einen Gewbespot mit ESR1-Amplifikation und ER-Überexpression ist in Abbildung 9 dargestellt. ESR1-Amplifikationen wurden in 17/75 (22,6%) der Primärtumoren gefunden. ER-Proteinexpression zeigten 103/148 (69,6%) Gewebeprobe(n) der insgesamt 46 auswertbaren Primärtumoren. Der direkte Vergleich der FISH- und der IHC-Resultate erbrachte eine hohe Korrelation zwischen ESR1-Amplifikation und ER-Expression. Es exprimierten fast alle (93%) der ESR1-amplifizierten Tumoren den Östrogenrezeptor, während nur die Hälfte der ESR1-normalen Tumore ein detektierbares Level der ER-Expression hatten ($p<0,0001$).

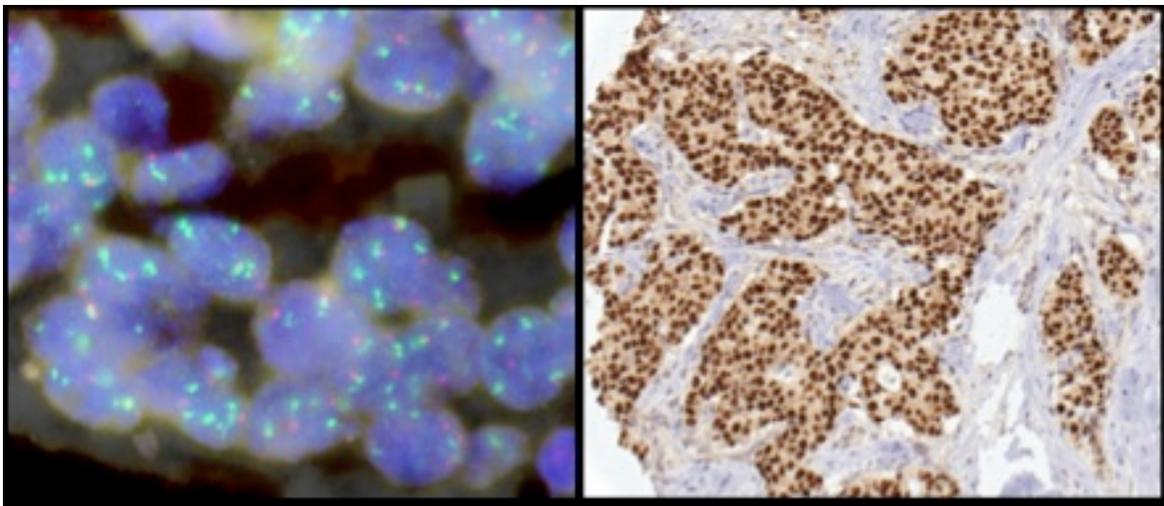


Abbildung 9: Gewbespots mit ESR1-Amplifikation (links, Zentromer 6 in orange und ESR1 in grün) und starker nukleärer Expression des Östrogenrezeptor-Proteins (rechts).

3.2 Heterogenität innerhalb einer Gewebeprobe

In dieser Analyse wurden der ESR1-Amplifikationsstatus und die ER-Expression zwischen verschiedenen Arealen einer Gewebeprobe (Primärtumoren und Metastasen) verglichen. Diese Areale waren auf den Replikatarrrays 1-4 repräsentiert. In die Auswertung wurden alle Gewebeproben eingeschlossen, bei denen wenigstens zwei Replikate analysierbar waren (n=454 für die FISH- und n=141 für die IHC-Analyse). Die erste Auswertung ergab eine intratumorale Heterogenität in 54/454 (11,9%) Fällen in der FISH und in 49/141 (34,1%) Fällen in der Immunhistochemie. Die genauere Untersuchung zeigte, dass sich die Diskrepanzen in der FISH aus nur geringfügig unterschiedlichen Genkopieanzahlen (3-6 Signale) ergaben. Nach unseren vordefinierten Kriterien zählten die Gains mit drei Gensignalen nicht zu den amplifizierten sondern zu den als normal gewerteten Gewebeproben, sodass ein Tumor, der in der einen Probe eine Amplifikation (ratio ESR1: Cen 6 \geq 2,0), in einer anderen Probe jedoch ein Gain enthielt, als diskrepanz analysiert wurde. Eine ähnliche Beobachtung ergab die genauere Betrachtung der IHC-Resultate. Hier erklärten sich die Diskrepanzen aus nur geringfügig unterschiedlichen Intensitäten in der Immunfärbung. Exemplarische Fälle von 10 randomisiert ausgewählten Tumoren sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Zehn diskrepante Fälle der IHC. Vier Gewebeproben eines jeden Tumors wurden auf einem Tissue Micro Array (TMA) analysiert. Die Zahlen geben den Total Score (TS) nach Allred an, welcher sich aus der Summe des Proportion Scores (PS) und des Intensity Scores (IS) ergibt. Ein positives Ergebnis ist definiert durch einen TS \geq 3, wohingegen ein TS von 0-2 als negativ betrachtet wird. Grau unterlegte Werte zeigen ein positives Östrogenrezeptor (ER)-Ergebnis nach den o. g. Kriterien an. - = nicht analysierbar.

Tumor #	ER Allred TS TMA #1	ER Allred TS TMA #2	ER Allred TS TMA #3	ER Allred TS TMA #4
1	-	3	0	-
2	3	5	-	0
3	4	3	-	0
4	5	4	-	0
5	0	0	8	-
6	-	3	0	3
7	3	3	0	4
8	0	5	6	-
9	0	0	4	5
10	0	0	0	3

Tabelle 4: Zehn exemplarische Fälle der diskrepanten FISH-Ergebnisse. Vier Gewebeprobe jedes Tumors wurden im TMA-Format hinsichtlich der Genkopiezahlen für das ESR1-Gen sowie zur Kontrolle für das Zentromer 6 untersucht. Die Zahlen geben die Genkopiezahlen für ESR1 bzw. die Anzahl des Zentromers 6 an. ESR1: Östrogenrezeptor-alpha; C6: Zentromer 6; -: nicht analysierbar. Grau unterlegte Werte zeigen eine ESR1-Amplifikation nach den o. g. Kriterien an.

Tumor #	TMA #1		TMA #2		TMA #3		TMA #4	
	ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6
1	-	-	3	2	4	2	2	2
2	-	-	4-6	2	3-4	2	3	2
3	-	-	4	2	-	-	3-4	2
4	4	2	4	2	2	2	3	2
5	4	2	2	2	3-4	2	-	-
6	2	2	2	2	-	-	4-6	2
7	3-4	2	-	-	4	2	2	2
8	3-4	2	4	2	4	2	4-6	2
9	2-4	2	3-4	2	4	2	2	2
10	-	-	3-4	2	2-4	2	4	2

3.3 Heterogenität innerhalb der Fernmetastasen

In einer dritten Analyse wurde der ESR1-Amplifikationsstatus und der Östrogenrezeptorstatus zwischen den unterschiedlichen Fernmetastasen einer Patientin verglichen. Es wurde jeweils die erste analysierbare Gewebeprobe der TMAs 1-4 eines jeden Tumors als Konsensus-Ergebnis genommen, um einen potentiellen statistischen Bias zu umgehen (s. o. „Heterogenität innerhalb einer Gewebeprobe“). Ein zusätzliches Einschlusskriterium war das Vorhandensein von mindestens zwei auswertbaren Metastasen einer Patientin.

Insgesamt waren in der FISH-Analyse weniger heterogene Fälle zu finden als in der Immunhistochemie. Innerhalb der 115 FISH-analysierbaren Patientinnen mit insgesamt 492 untersuchten Metastasen fanden sich 16 Patientinnen (13,9%) mit unterschiedlichem ESR1-Status in den jeweiligen Metastasen. In der IHC wurde eine Heterogenität zwischen den einzelnen Metastasen (n=657) in Bezug auf den ER-Status bei 42/141 Patientinnen (30,5%) festgestellt. Bei näherer Betrachtung der diskrepanten Fälle fiel auf, dass bei 13/16 Fällen in der FISH und bei 22/42 Fällen in der IHC die Unterschiede hauptsächlich auf geringfügige Diskrepanzen, z. B. leicht abweichenden Anzahl der ESR1-Genkopiezahl (Gain versus Amplifikation) in der FISH und diskrete Unterschiede in der Farbintensität in

der IHC, zurückzuführen waren. Echte Diskrepanzen zeigten sich in der FISH bei drei Patientinnen (Patientin # 5, 28, 84) und in der IHC bei 20 Fällen. Vier Patientinnen mit den dazugehörigen FISH- und IHC- Resultaten sind exemplarisch in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vier exemplarische Fälle der diskrepanten FISH-Ergebnisse mit den entsprechenden Resultaten der IHC. Vier Gewebeproben jedes Tumors wurden im TMA-Format hinsichtlich der Genkopiezahlen für das ESR1-Gen sowie zur Kontrolle für das Zentromer 6 untersucht. Die Zahlen der linken Hälfte der Tabelle geben die Genkopiezahlen für ESR1 bzw. die Anzahl des Zentromers 6 an.

ESR1: Östrogenrezeptor-alpha-Gen; C6: Zentromer 6; -: nicht analysierbar; grau unterlegte Werte zeigen eine ESR1-Amplifikation nach den o. g. Kriterien an.

Die rechte Hälfte der Tabelle zeigt den Total Score (TS) nach Allred an, welcher sich aus der Summe des Proportion Scores (PS) und des Intensity Scores (IS) in der immunhistochemischen Untersuchung der Östrogenrezeptorexpression ergibt. Ein positives Ergebnis ist definiert durch einen TS ≥ 3 , wohingegen ein TS von 0-2 als negativ betrachtet wird.

Grau unterlegte Werte zeigen ein positives Östrogenrezeptor (ER)-Ergebnis nach den o. g. Kriterien an. - = nicht analysierbar.

Pat #	Meta-stase 1-5	TMA #1		TMA #2		TMA #3		TMA #4		TMA #1	TMA #2	TMA #3	TMA #4
		ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6	ER Allred TS	ER Allred TS	ER Allred TS	ER Allred TS
5	Meta 1	-	-	-	-	-	-	2	2	-	8	8	8
	Meta 2	4	2	3-4	2	3-4	2	3	2	7	6	7	6
	Meta 3	-	-	3	2	6-8	2	-	-	-	-	7	-
	Meta 4	4	2	-	-	6-8	2	2	2	8	7	8	-
	Meta 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
80	Meta 1	-	-	2	2	2	2	-	-	-	4	6	7
	Meta 2	4	2	2	2	2	2	2	2	7	4	5	4
	Meta 3	-	-	-	-	-	-	2	2	0	0	0	4
	Meta 4	-	-	2	2	2	2	2	2	5	0	4	4
	Meta 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
99	Meta 1	-	-	4	2	-	-	-	-	7	7	5	8
	Meta 2	4-6	2	4-6	2	6	2	6-8	2	8	8	8	8
	Meta 3	4-6	2	4-8	2	6	2	5-8	2	8	8	8	8
	Meta 4	3	2	4	2	2	2	4-7	2	8	6	7	8
	Meta 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	6	6
100	Meta 1	-	-	-	-	3	2	-	-	0	6	8	-

Meta 2	-	-	4-6	2	4-5	2	2	2	8	8	8	8
Meta 3	-	-	4-6	2	4-6	2	-	-	8	8	8	-
Meta 4	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	0	-
Meta 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4 Vergleich von Primärtumoren und den Fernmetastasen

In dieser Analyse wurden die Fernmetastasen mit ihren dazugehörigen Primärtumoren hinsichtlich des ESR1-Amplifikationsstatus und des ER-Status verglichen. Dabei wurden diejenigen Patientinnen in die Analyse einbezogen, die mindestens eine auswertbare Metastase sowie einen auswertbaren Primärtumor besaßen. Von jedem Tumor wurde erneut nur die erste auswertbare Gewebeprobe als Konsensusresultat übernommen, um den statistischen Fehler der intratumoralen Heterogenität zu umgehen. In der FISH erfüllten 35 Patienten mit 149 unterschiedlichen Metastasen diese Kriterien. IHC-Daten waren von 52 Patientinnen mit 247 Metastasen verfügbar. In der FISH stimmten die Ergebnisse der Primärtumoren mit denen der Metastasen in hohem Maße überein. 30/35 Patienten (85,7%) zeigten ein konkordantes Ergebnis. Die diskrepanten Fälle waren erneut größtenteils auf sogenannte Borderline-Resultate zurückzuführen (Daten werden nicht gezeigt). Die Übereinstimmungen der IHC-Resultate waren deutlich geringer, nur 56% der Primärtumoren waren mit ihren zugehörigen Metastasen konkordant. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Abbildung 10 und 11 sowohl für die FISH-Analyse als auch für die immunhistochemische Untersuchung graphisch dargestellt.

Ein Hinweis für echte Heterogenität wurde lediglich bei einer Patientin (Patientin # 104) festgestellt. Diese Patientin zeigte Amplifikationen im Primärtumor, hatte jedoch normale Genkopiezahlen des ESR1 in allen acht auswertbaren Metastasen. Interessanterweise war auch der ER-Status dieser Patientin heterogen. ESR1- und ER-Status dieser Patientin sind in Abbildung 12 dargestellt.

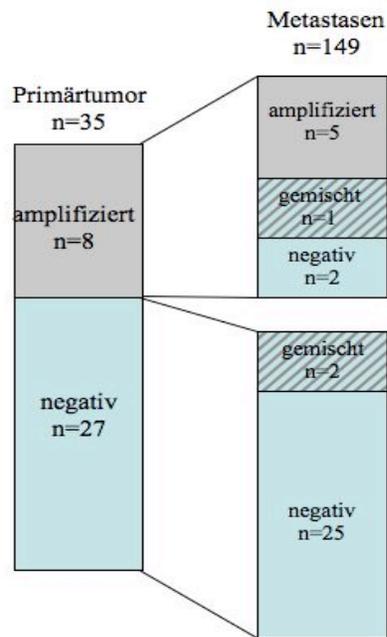


Abbildung 10: Vergleich des ESR1-Status zwischen Primärtumor und den verschiedenen Fernmetastasen.

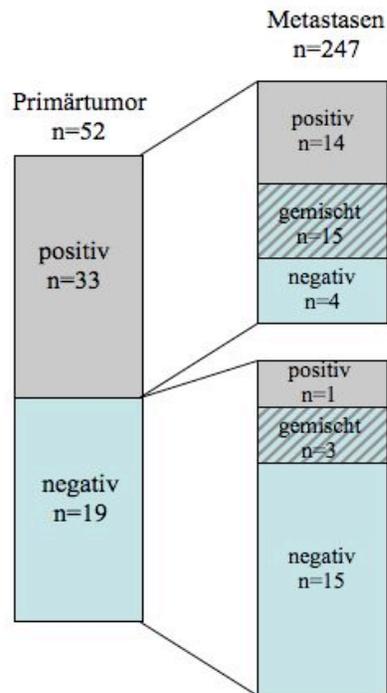
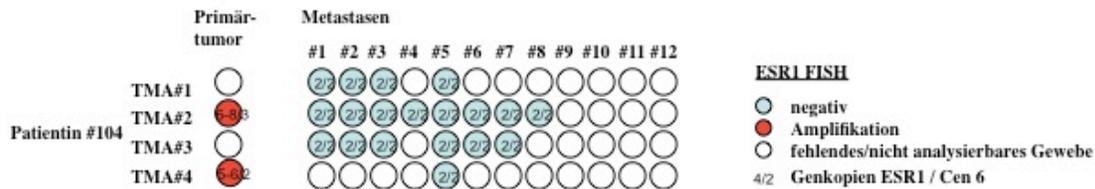


Abbildung 11: Vergleich des ER-Status zwischen Primärtumor und den verschiedenen Fernmetastasen.

A: FISH-Ergebnisse der Patientin #104



B: IHC-Ergebnisse der Patientin #104

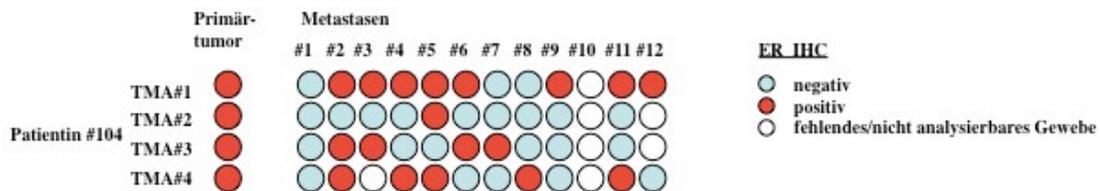


Abbildung 12: ESR1- und ER-Status der Patientin #104.

3.5 Analysierbarkeit innerhalb der verschiedenen Gewebetypen

Während der Auswertung der Daten, stellte sich heraus, dass die verschiedenen Gewebetypen, wie beispielsweise Lunge, Leber und Knochenmark, unterschiedlich gute Ergebnisse in der FISH-Analyse zeigten. Diese Tatsache lässt sich durch gewebespezifische Eigenschaften und somit auch durch das Verhalten gegenüber chemischen Reagenzien erklären.

Besonders gut analysierbar zeigten sich Gewebe aus dem Ovar, den Lymphknoten, der Haut und dem Gehirn, welche in 70 bis 90% auswertbare FISH-Ergebnisse lieferten. Wesentlich schlechtere Resultate erbrachten Gewebeproben aus der Lunge, den Meningen, dem Myokard sowie dem Knochenmark. Hier war die FISH-Analyse in weniger als 50% der Fälle auswertbar.

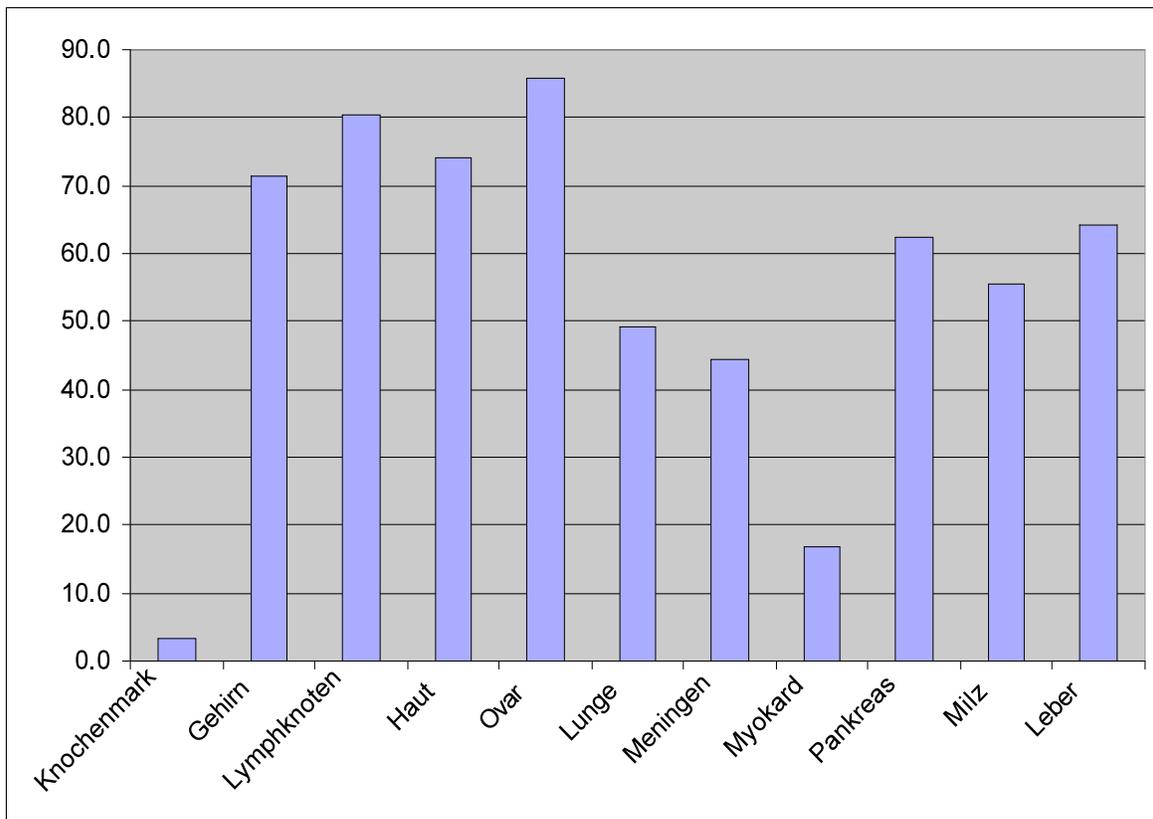


Abbildung 13: Analysierbarkeit der unterschiedlichen Gewebetypen

4 Diskussion

Betrachtet man die Komplexität der Tumorgenese und Metastasierungskaskade, wie sie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben ist, wird deutlich, dass ein Primärtumor auf dem Weg seiner Tumorprogression und -metastasierung eine Vielzahl von Veränderungen hinsichtlich seiner Eigenschaften und letztlich seiner Genexpressionsmuster aufweist. Die Bemühungen der aktuellen Forschung, genaue Genkartierungen und -analysen auf diesem mehrstufigen Prozess anzustreben, scheinen bei Weitem noch nicht abgeschlossen zu sein. Vielmehr dürften aktuelles Verständnis und bisher bestehende molekulargenetische Resultate Puzzleteile eines Gesamtbildes sein.

Wie verschiedene Arbeitsgruppen feststellen konnten, zeigen Mammakarzinome auf dem Weg der Filialisierung unterschiedliche Genexpressionsmuster, je nachdem welches Organ Ort der Metastasierung ist (Kang et al. 2003, Minn et al. 2005, Bos et al. 2009 und Tabariès et al. 2011). Bereits diese Tatsache verdeutlicht, dass eine ganzheitliche Behandlung der Fragestellung in weiter Ferne zu liegen scheint. So bildet jede durchgeführte Untersuchung - wie auch die von uns durchgeführte Analyse des ESR1-Gens - einen wertvollen Beitrag und liefert zusätzliche Informationen, die es ermöglichen, das Verständnis von Tumoren zu erweitern.

Nachdem Nembrot 1990 erstmals eine Amplifikation des ESR1-Gens mittels Southern Blot beschrieb, blieben weitere Details lange unentdeckt (Nembrot et al. 1990). Basierend auf einer Matrix-CGH-Untersuchung wurden Alterationen des ESR1-Gens auf Chromosom 6q25 festgestellt (Nessling et al. 2005). Anschließend analysierten Holst et al. 2007 die ESR1-Amplifikation: eine FISH-Analyse von insgesamt 1739 Mammakarzinomen zeigte eine ESR1-Amplifikationsrate von 20,6%. Zudem wurde diese Amplifikation auch in benignen sowie präinvasiven Läsionen der Mamma detektiert (siehe oben).

Die Prävalenz der ESR1-Amplifikation beim Mammakarzinom wurde in den nachfolgenden Studien mit z. T. hochgradig diskrepanten Ergebnissen analysiert. Während einige Arbeitsgruppen nur weniger als 5% Amplifikationen mit FISH und array-CGH fanden (z.B. Brown et al. 2008, Vincent-Salomon et al. 2008, Horlings et al. 2008 und Reis-Filho et al. 2008), beschrieben Ejlertsen etwa 13% und Tomita 22,6% Amplifikationen (Ejlertsen et al. 2012, Tomita et al. 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen eine hohe Amplifikationsrate von 23%. Vermutlich sind vor allem methodische Unterschiede für diese diskrepanten Ergebnisse verantwortlich: Holst et al. verwendeten ein manuelles Auszählsystem, während sich die Daten von Brown et al. auf eine automatische, maschinelle Auszählung stützten, die ursprünglich zur Auswertung von

HER2-Amplifikationen konzipiert wurde. Da diese Amplifikationen typischerweise hochgradig sind und durch grosse Signalcluster mit >20 Gensignalen leicht auffallen, ist nicht verwunderlich, dass die im Vergleich geringgradige ESR1-Amplifikation (mit 4-6 Genkopien) durch eine solche Software nicht zuverlässig detektiert werden kann.

4.1 Technische Schwierigkeiten der ESR1-Analyse

Unsere Studie bestätigte die Amplifikationsrate der von Holst et al. beschriebenen 21%. 22,6% der Primärtumoren lagen als amplifiziert vor. Die gute Reproduzierbarkeit der Amplifikationsrate der Ursprungsstudie von Frederik Holst durch die Auswertung eines anderen Untersuchers (Helen Haas) spricht dafür, dass eine zuverlässige Bestimmung der Amplifikationsrate von ESR1 trotz der geringen Kopiezahl der amplifizierten Tumoren möglich ist, wenn der Auswerter von einem erfahrenen FISH-Experten trainiert wurde. Häufig war allerdings eine genaue Aussage darüber, ob in einer amplifizierten Gewebeprobe nun beispielsweise sechs oder acht Genkopien vorlagen, nicht sicher zu treffen. Wir entschieden uns in solchen Situationen, einen Mittelwert als tatsächlichen Zählwert anzunehmen (im angeführten Beispiel ergab sich dann eine Signal-Anzahl von sieben).

Auch Hintergrundsignale, ein wesentlicher Störfaktor bei der Auszählung einer selbst hergestellten Gensonde, sind nicht ausser Acht zu lassen. Diese dürften bei anderen Amplifikationen wie z. B. der Her2/Neu-Amplifikation mit großen Amplifikationsclustern von mehr als zehn Genkopien weniger stark ins Gewicht fallen als bei unserer Untersuchung. Die Eigenschaft der ESR1-Amplifikation, aus einem kleinen Amplicon zu bestehen und zumeist nur wenige Genkopievermehrungen aufzuweisen, macht die Analyse und genaue Auszählung schwierig. Diese technischen Probleme dürften heute bei Vorhandensein einer kommerziell hergestellten ESR1-Sonde wie der SPEC ESR1/CEN 6 Dual Color Probe von ZytoLight® (ZytoVision GmbH) eine geringere Rolle spielen. Wahrscheinlich würde unsere Untersuchung mit dieser kommerziell hergestellten Gensonde genauere Resultate ergeben haben, die "Borderline"-Fälle hätten sich gegebenenfalls minimiert.

4.2 Heterogenität

Das Hauptaugenmerk bei der Auswertung und Interpretation unserer Daten galt der Heterogenität der ESR1-Amplifikation. Insbesondere die Analyse der FISH-Daten zeigte keinen Anhalt für relevante Heterogenität. Diskrepanzen zeigten sich auf intratumoraler Ebene in 11,9% (54/454 Fälle), innerhalb der Fernmetastasen in 13,9% (16/115

Patientinnen mit insgesamt 492 untersuchten Metastasen) und in 14,3% (5/35 Patientinnen mit insgesamt 149 analysierten Metastasen) beim Vergleich der Primärtumoren und deren zugehörigen Metastasen. Somit ergab sich annäherungsweise in 90% der FISH-Analysen ein identisches FISH-Resultat, welches alle untersuchten Gewebeproben einer Patientin eindeutig in die beiden Entitäten amplifiziert und nicht-amplifiziert zuordnet.

Die genauere Betrachtung dieser diskrepanten Fälle deutete zudem darauf hin, dass viele der Unterschiede eher auf technische Ursachen denn auf "echte" Heterogenität zurückzuführen waren. Zumeist resultierten die Unterschiede in der FISH-Analyse hauptsächlich aus geringfügigen Variationen der ESR1-Kopiezahl. Nach den vordefinierten Kriterien haben zum Teil kleinste Abweichungen in der Anzahl der Genkopien zu einer unterschiedlichen Klassifizierung der Gewebeprobe (amplifiziert oder nicht-amplifiziert) geführt. Biologisch ist jedoch nicht anzunehmen, dass eine ESR1-Genkopie mehr oder eine ESR1-Genkopie weniger tatsächlich einen tumorrelevanten Einfluss ausübt. So sei hier kurz auf ein Fallbeispiel, dessen FISH-Resultate in Tabelle 6 dargestellt sind, exemplarisch verwiesen.

Tabelle 6: Fallbeispiel der Patientin #39. Vier Gewebeproben des Primärtumors und der drei dazugehörigen Metastasen wurden im TMA-Format hinsichtlich der Genkopiezahlen für das ESR1-Gen sowie zur Kontrolle für das Zentromer 6 untersucht. Die Zahlen geben die Genkopiezahlen für ESR1 bzw. die Anzahl des Zentromers 6 an. ESR1: Östrogenrezeptor-alpha; C6: Zentromer 6; -: nicht analysierbar. Grau unterlegte Werte zeigen eine ESR1-Amplifikation nach den o. g. Kriterien an.

Pat #39	TMA #1		TMA #2		TMA #3		TMA #4	
	ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6	ESR1	C6
Prim	-	-	4-5	2	3-4	2	3	2
Meta #1	-	-	-	-	-	-	-	-
Meta #2	-	-	4	2	-	-	3-4	2
Meta #3	4	2	4	2	2	2	3	2

Solche sogenannte Borderline (Grenz-)befunde treten auch bei anderen Genen, zum Beispiel bei Amplifikationen des HER2-Gens auf. Hier sind diese jedoch selten und werden nur in etwa 2% der Tumore beschrieben (Sauter et al. 2009). Die weitaus überwiegende Zahl der Mammakarzinome zeigt bezüglich HER2 einen klaren Befund (amplifiziert oder nicht-amplifiziert). Im Gegensatz dazu ist die Situation bei ESR1 markant komplizierter. Durch die generell geringe Kopiezahl in ESR1-amplifizierten Tumoren (im Durchschnitt 5 bis 6 Kopien in dieser Studie) ist die Fraktion der Tumore, die mit nur 4 Genkopien gerade an der Grenze zur Amplifikation liegen (3 Genkopien und 2 Zentromerkopien = nicht-

amplifiziert, 4 Gen-Kopien und 2 Zentromerkopien = amplifiziert) wesentlich höher. In dieser Studie wurden 68 Gewebeproben identifiziert, die mit 4:2 Kopien gerade die formalen Kriterien für eine Amplifikation erfüllten. Es sei hier vergleichend die Anzahl der Signale des HER2-Gens beim Vorliegen einer Amplifikation erwähnt, welche typischerweise bei mehr als 10-20 Kopien pro Zelle liegt (Lebeau et al. 2001).

Es ist also davon auszugehen, dass dieser nur geringe Amplifikationslevel die FISH-Untersuchung des ESR1-Gens deutlich schwieriger macht. Zum einen fällt das Vorhandensein von Hintergrundsignalen beim Auszählen einzelner Signale deutlicher ins Gewicht, zum anderen ist die Unterscheidung zwischen einer nicht-amplifizierten und einer amplifizierten Tumorzelle wesentlich schwieriger zu treffen. Es kommt leichter zu fehlerhaften Auszählungen in beide Richtungen und zum Vorhandensein einer hohen Anzahl der als "Borderline"-Fälle bezeichneten Entität. Wie oben erwähnt, sind die in unserer Analyse als diskrepanz aufgefallenen Fälle bei genauerer Betrachtung also lediglich auf geringfügig unterschiedliche Genkopien zurückzuführen. "Echte" Heterogenität besteht praktisch nicht.

Als Ausnahme sei hier ein Fall aufgeführt, die Patientin #104, welche in den Gewebeproben des Primärtumors Amplifikationen zeigte und in den acht auswertbaren von insgesamt zwölf vorhandenen Metastasen eine normale Genkopiezahl aufwies. Basierend auf den FISH-Befunden wäre zu erwarten, dass bei einer endokrinen Therapie zwar die ER/ESR1 positiven Zellen des Primärtumors ansprechen, jedoch vielleicht nicht die negativen Zellen der Lymphknotenmetastasen. Insgesamt ist die Entwicklung einer Therapieresistenz bisher nur unzureichend geklärt. Im Fall der Patientin #104 ergibt jedoch die Betrachtung der immunhistochemischen Resultate keine wesentliche Korrelation des ESR1-Verlustes mit einem Verlust der ER-Expression. Die vier auswertbaren Proben des Primärtumors der Patientin zeigten insgesamt, die analysierbaren Metastasen zu einem großen Teil ein positives ER-Ergebnis in der Immunhistochemie. In diesem Fall scheint also ein ER-positiver, jedoch ESR1 nicht-amplifizierter Tumorzellklon zur Metastasierung gekommen zu sein. Andere Mechanismen der ER- α -Regulation, wie sie von Miyoshi 2010 beschrieben wurden, müssen hier für die Rezeptorexpression verantwortlich sein. Neben der ESR1-Amplifikation sind erhöhte Promotoraktivität auf transkriptionaler Ebene sowie ein verminderter Abbau durch Ubiquitination und proteasomale Prozesse am ehesten ursächlich für eine ER- α -Expression (Miyoshi et al. 2010).

4.3 Klinische Relevanz

Die hohe Konkordanz (86%) der ESR1-Amplifikation des Primärtumors und der korrelierenden Metastasen deutet nur auf wenig Heterogenität hin. Nach Vorliegen unserer Daten scheint es unwahrscheinlich, dass ein unterschiedlicher ESR1-Amplifikationsstatus zwischen dem operativ entfernten Primärtumor, an dem die molekulare Analyse durchgeführt wird, und den Metastasen, die im Körper verbleiben und “ungetestet” therapiert werden, für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der antihormonellen Therapie verantwortlich ist.

Auch bei der Untersuchung der Primärtumoren kann davon ausgegangen werden, dass ein positiver Befund an einer Biopsie genauso repräsentativ für den ESR1-Status des Tumors ist wie ein negativer. In der vorliegenden Studie fanden sich keine klaren Hinweise für eine signifikante intratumorale Heterogenität: 88,1% der untersuchten Tumore zeigten ein identisches ESR1-Resultat. Hierbei wurden jeweils zwei bis vier Gewebeproben aus unterschiedlichen Bereichen des Tumors untersucht.

Interessanterweise zeigte keiner der klar amplifizierten oder nicht-amplifizierten Fälle diskrepante Resultate hinsichtlich des ESR1-Status zwischen den Primärtumoren und den dazugehörigen Metastasen. Wie Holst et al. bereits 2007 das Vorhandensein von ESR1-Amplifikationen auch bei Mammakarzinomvorstufen beschrieben, ist darüber hinaus davon auszugehen, dass die Entwicklung einer ESR1-Amplifikation ein recht frühes Ereignis in der Tumorgenese des Mammakarzinoms ist und es beim Vorhandensein dieser Alteration bleibt.

Dass ESR1-amplifizierte und nicht-amplifizierte Anteile innerhalb eines Primarius als möglicher Ausgangspunkt für eine Resistenzentwicklung gegenüber einer antihormonellen Therapie (z. B. mit Tamoxifen®) durch Bildung von amplifizierten und nicht-amplifizierten Metastasen nebeneinander bestehen, bestätigt sich nicht. Auch die Hypothese, dass sich aus einem ESR1-amplifizierten Mammakarzinom in Folge einer antihormonellen Therapie (im Sinne eines Selektionsdruckes) eine nicht-amplifizierte Metastase ausbildet, lässt sich anhand unserer Daten nicht bestätigen.

Des Weiteren scheint die histologische Untersuchung auch eines kleinen Gewebestückes eines Tumors, wie sie beispielsweise bei einer Feinnadelbiopsie durchgeführt wird, ein durchaus repräsentatives Ergebnis hinsichtlich des ESR1-Status des gesamten Tumorgewebes zu liefern.

Schließlich wird die genaue Analyse der Resistenzentwicklung gegenüber der endokrinen Therapie durch diese Arbeit nicht geklärt und bedarf weiterer, größer angelegter Studien.

4.4 ESR1-FISH im Vergleich zur ER-IHC

Im direkten Vergleich der ESR1-Amplifikation mit der ER-Expression konnten wir vorausgegangene Untersuchungsergebnisse, die eine hohe Übereinstimmung der ESR1-Amplifikation mit einer ER-Expression in der IHC vermerkten (Holst et al. 2007), bestätigen. Auch in unserer Analyse zeigten 93% der ESR1-amplifizierten Mammakarzinome ein positives ER-Resultat in der IHC. Sogar die Tumore mit einer geringen ESR1-Amplifikation mit Kopiezahlen von 4-6 zeigten zu einem hohen Prozentsatz (circa 80%) einen maximalen Allred-Score von 7-8. Allerdings bestätigen die mehr als 50% der stark IHC-positiven Fälle, bei denen keine erhöhte ESR1-Genkopiezahl vorlag, dass die ESR1-Amplifikation nur einer von mehreren Mechanismen zur vermehrten Expression des ER-Rezeptors ist.

Allerdings ergab die Auswertung der Daten der Immunhistochemie eine höhere Heterogenität als die FISH-Analyse: Gemäss IHC zeigte sich intratumorale Heterogenität in 34,1% (49/141 Fälle), innerhalb der Fernmetastasen in 30,5% (42/141 Fälle) und beim Vergleich der Primärtumoren und deren Fernmetastasen immerhin in 54% (52 Primärtumore mit 247 analysierten Metastasen) der untersuchten Fälle. Der detaillierte Vergleich der IHC-Ergebnisse innerhalb individueller Tumoren zeigte jedoch, dass es sich auch hier vor allem um technische Artefakte handeln dürfte. So fallen ER-negative Bereiche eines Tumors in der Regel durch eine komplette Abwesenheit jeglicher Färbung auf. Es ist zu vermuten, dass vor allem eine suboptimale Fixierung in einigen Tumorbereichen zu einem Versagen der Immunfärbung geführt hat. Solche Fixierungsprobleme beruhen oft auf Eigenarten des Gewebes (z. B. Fetthaltigkeit) bzw. ungenügende Fixierungszeit, die es verhindert, dass das Fixierungsmittel alle Teile des Gewebes gleichmässig durchdringt (Sauter et al. 2009).

Zudem ist damit zu rechnen, dass Gewebe aus Autopsiematerial (z. B. Fernmetastasen) oft eine stark verschlechterte Qualität ausweisen (z. B. durch beginnende Autolyse) und daher nicht mehr optimal immunreaktiv sind. Zwar „leidet“ die FISH-Analyse in gleichem Masse wie die IHC an „schlechtem“ Gewebe, jedoch können hier keine falsch-negativen Befunde auftreten: Sollte eine Gewebeprobe nicht für eine FISH-Analyse geeignet sein, so sind keinerlei Signale zu sehen. Ein echter FISH-negativer Befund (im Sinne einer nicht vorhandenen Amplifikation) lässt sich jedoch klar von einem solchen „Analyse-Versager“ anhand der sichtbaren normalen zwei Gensignale unterscheiden. Im Gegensatz dazu kann bei der Immunhistochemie nicht zwischen einem negativen Befund aufgrund eines Versagens der Analyse oder echter negativer Expression unterschieden werden. Tatsächlich

zeigt der Vergleich der FISH und IHC Daten am Fall #104 (siehe Abbildung 12A und 12B), dass nur wenige Gewebesots mit der FISH interpretierbar waren, jedoch viele (und darunter zahlreiche IHC-negative) mit der IHC. Tapia hat am Beispiel von HER2 gezeigt, dass Gewebeproben, die nicht mit FISH Interpretierbar sind, typischerweise auch unzuverlässige Ergebnisse mit IHC zeigen (Tapia et al. 2004). Zusammenfassend deuten die Befunde dieser Arbeiten also darauf hin, dass die vergleichsweise hohe „Heterogenität“ mit der ER-IHC in der vorliegenden Studie eher technisch bedingt ist.

4.5 Einordnung in die aktuelle Studienlage

Die meisten Daten zur Untersuchung möglicher Heterogenitäten beim Mammakarzinom findet man bezüglich des Her2-Gens. Hier sind die Gen-Amplifikationen sowohl intratumoral als auch zwischen unterschiedlichen Tumorgeweben weitestgehend homogen. In FISH-Analysen des Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus im Vergleich zu den korrespondierenden Mammakarzinomen des pathologischen Institutes des Universitätsspitals Basel fanden sich keine Hinweise auf echte Diskrepanzen, insbesondere nach Korrektur der „Borderline“-Fälle (Tapia et al. 2007).

Unsere Daten sprechen gegen das Vorhandensein echter, signifikanter Heterogenität auch bezüglich des ESR1-Status, sodass man schließen kann, dass die Entwicklung einer ESR1-Amplifikation ein frühes Ereignis in der Karzinomentstehung ist. Diese Annahme untermauert die zentrale Rolle des Östrogen-Rezeptors in der Mammakarzinomklassifizierung und der standardisiert durchgeführten Routinediagnostik, welche feingewebliche, immunhistochemische und zunehmend auch molekulargenetische Untersuchungen einer Probebiopsie enthält. Durch die Homogenität der ESR1-Amplifikationen beim Brustkrebs eignet sich der Östrogen-Rezeptor also hervorragend zum Einsatz der systemischen Therapie.

Möglicherweise werden in der Zukunft stärkere Diskrepanzen mit signifikanten Heterogenitäten anderer Genamplifikationen gefunden. Bekannt ist bereits ein Resistenzmechanismus beim Prostatakarzinom: Nach antihormoneller Therapie (Orchiektomie, LHRH-Analoga oder Östrogene) wird eine zuvor nicht bekannte Amplifikation des Androgen-Rezeptors beobachtet (Visakorpi et al. 1995). So könnten auch andere Heterogenitäten einen starken negativen Einfluss auf die zur Therapie genutzten Zielstrukturen haben und zu einem Versagen einer Behandlung führen.

5 Zusammenfassung

Die erhobenen Daten ergeben keinen Anhalt für relevante Heterogenität hinsichtlich des ESR1-Status. Die ESR1-Amplifikation ist innerhalb eines Tumorareals (=intratumoral) homogen verteilt. Ebenso entspricht die ESR1-Genkopiezahl der Primärtumoren weitestgehend derjenigen der Fernmetastasen (=intertumoral). Diese Tatsache lässt annehmen, dass sich der Amplifikationsstatus weder endogen im Verlauf der Tumorprogression (beispielsweise während der Metastasierung) noch exogen z. B. unter einer antihormonellen Therapie (z. B. mit Tamoxifen®) verändert.

Da ESR1-Amplifikationen bereits in präinvasiven Mammaläsionen gefunden werden (Holst et al. 2007), scheint die ESR1-Amplifikation ein recht frühes, entscheidendes Ereignis in der Tumorgenese zu sein. Unsere Daten, die zwar keine Aussage über den ESR1-Status möglicher Mammakarzinomvorstufen unserer Patientinnen treffen können, stellen jedoch eine Erweiterung der Erkenntnis dar: Sie zeigen, dass der ESR1-Status der Mammakarzinommetastasen, der oft erst Jahre nach Stellung der Erstdiagnose ermittelt wird, dem des Primarius entspricht. Damit kristallisiert sich heraus, dass die ESR1-Amplifikation dem Tumor nicht nur in der Initiierung des Tumorgeschehens, sondern auch in den folgenden Schritten der Tumorprogression Überlebensvorteile verschafft und es somit beim Vorhandensein dieser Amplifikation bleibt. Vielleicht öffnet gerade diese Konstanz die Möglichkeit für weiterführende Therapiestrategien bzw. Denkansätze.

Die erstmals 2007 von Holst et al. beschriebene Amplifikationsrate von 21% konnte bestätigt werden (Holst et al. 2007). Die in unserer FISH-Analyse ermittelte Amplifikationsrate betrug 22,6%. Diese Daten deuten auf eine gute Reproduzierbarkeit der durchgeführten FISH-Analyse hin, auch unter der Verwendung der selbst hergestellten, störanfälligen Bac-Gensonde. Unter standardisierten Bedingungen mit einer kommerziellen Sonde dürfte die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse noch zuverlässiger sein.

Im direkten Vergleich der Immunhistochemie mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zeigte sich die IHC als weniger zuverlässig. Sie lieferte in 35,6% der Fälle inhomogene Resultate, wohingegen die FISH nur in 12,4% der Fälle Diskrepanzen aufwies. Allerdings war die Korrelation von ESR1-amplifizierten und ER-positiven Tumoren mit 93% hoch. 50% der ER-positiven Tumore wiesen keine ESR1-Amplifikation auf. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend und gut vereinbar mit den von Miyoshi beschriebenen, alternativen Regulationsmechanismen der ER-Expression (siehe oben). Hervorzuheben ist jedoch, dass insbesondere die therapieentscheidenden Berührungspunkte der FISH-Analyse und der

Immunhistochemie, nämlich die in der Diagnostik ermittelte Aussage, ob ein Mammakarzinom ER-positiv bzw. ESR1-amplifiziert ist, übereinstimmen. Dementsprechend ist sicherlich leitliniengerechtes Vorgehen in der Routinediagnostik des Mammakarzinoms mit regelmäßig durchgeführter immunhistochemischer Untersuchung und ergänzender ESR1-FISH-Analyse sinnvoll. Zweifelsfrei sollte die Möglichkeit der FISH-Untersuchung bei geringsten Unklarheiten vermehrt angewendet werden.

Die Resistenzentwicklung gegenüber einer antihormonellen Therapie bleibt bedauerlicherweise auch nach Auswertung unserer Daten unbeantwortet. Ein denkbarer genetischer Shift mit Verlust der ESR1-Amplifikation als Antwort auf eine antihormonelle Behandlung bestätigt sich bei hoher Konkordanz des ESR1-Status nicht. Wichtige Erkenntnisse liefert jedoch die Konstanz der ESR1-Resultate hinsichtlich der Diagnostik und der Rolle der ESR1-Amplifikation: Wie bereits zuvor vermutet scheint die ESR1-Amplifikation bei ihrem Auftreten ein sehr frühes und durchaus wichtiges Ereignis in der Tumorentwicklung und -progression zu sein (Holst et al. 2007). Zeigt ein primäres Mammakarzinom bei Diagnosestellung eine ESR1-Amplifikation, so ist diese auch Jahre später an den autopsisch gewonnenen Fernmetastasen nachzuweisen. Während die Tumorzellen im Krankheitsverlauf im Rahmen der Filialisierung und im Verlauf der Zeit (häufig Jahre) einige Generationen durchgemacht haben dürften, bleibt der ESR1-Status unverändert.

Um genauere Aussagen z. B. über unterschiedliches Therapieansprechen oder Resistenzentwicklungen bei Mammakarzinomen machen zu können, sind jedoch weitere Studien und Untersuchungen erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

- Adelson K., Germain D., Raptis G., Biran N.: Hormonal Modulation in the Treatment of Breast Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2011 Sep; 40(3): 519-532.
- Arrechea Irigoyen M., Vicente García F., Córdoba Iturriagoitia A., Ibáñez Beroiz B., Santamaría Martínez M., Guillém Grima F.: Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. *An Sist Sanit Navar*, 2011 May-Aug; 34(2): 219-233.
- Baum M., Houghton J., Riley D.: Results of the Cancer Research Campaign Adjuvant Trial for Perioperative Cyclophosphamide and Long-Term Tamoxifen in Early Breast Cancer reported at the tenth year of follow-up. Cancer Research Campaign Breast Cancer Trials Group. *Acta Oncol*, 1992; 31(2): 251-257.
- Bombonati A., Sgroi D. C.: The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol*. 2011 Jan; 223(2): 307-317.
- Bos P. D., Zhang X. H., Nadal C., Shu W., Gomis R. R., Nguyen D. X., Minn A. J., van de Vijver M. J., Gerald W. L., Foekens J. A., Massagué J.: Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009 Jun 18; 459(7249): 1005-1009.
- Brown D. M., Ruoslahti E.: Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*. 2004 Apr; 5(4): 365-374.
- Brown L. A., Hoog J., Chin S. F., Tao Y., Zayed A. A., Chin K., Teschendorff A. E., Quackenbush J. F., Marioni J. C., Leung S., Perou C. M., Neilsen T. O., Ellis M., Gray J. W., Bernard P. S., Huntsman D. G., Caldas C.: ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet* 2008, 40: 806-807; author reply. 810-802.
- Buerger H., Otterbach F., Simon R., Schäfer K. L., Poremba C., Diallo R., Brinkschmidt C., Dockhorn-Dworniczak B., Boecker W.: Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*. 1999 Dec; 189(4): 521-526.
- Burandt E., Sauter G.: HER2 ASCO guidelines. The answer to everything? *Pathologe*, 2010 Oct; 31 Suppl 2: 285-291.
- Campbell C. I., Thompson D. E., Siwicky M. D., Moorehead R. A.: Murine Mammary Tumor Cells with a Claudin-Low Genotype. *Cancer Cell Int*, 2011 Aug 16; 11(1): 28.

-
- Campbell L. L., Polyak K.: Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 2007 Oct 1; 6(19): 2332-2338.
- Carey L. A., Perou C. M., Livasy C. A., Lynn L. G.: Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006; (295): 2492–2502.
- Colombo P. E., Milanezi F., Weigelt B., Reis-Filho J. S.: Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Res*, 2011 Jun 27; 13(3): 212.
- Cowley S. M., Parker M. G.: A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999 Apr-Jun; 69(1-6): 165-175.
- De Medina P., Silvente-Poirot S., Poirot M.: Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy*, 2009 Oct; 5(7): 1066-1067.
- Dirat B., Bochet L., Dabek M., Daviaud D., Dauvillier S., Majed B., Wang Y. Y., Meulle A., Salles B., Le Gonidec S., Garrido I., Escourrou G., Valet P., Muller C.: Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1; 71(7): 2455-2465.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, EBCTCG: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472): 1687-1717.
- Ejlertsen B., Aldridge J., Nielsen K. V., Regan M. M., Henriksen K. L., Lykkesfeldt A. E., Müller S., Gelber R. D., Price K. N., Rasmussen B. B., Viale G., Mouridsen H.; Danish Breast Cancer Cooperative Group; BIG 1-98 Collaborative Group; International Breast Cancer Study Group: Prognostic and predictive role of ESR1 status for postmenopausal patients with endocrine-responsive early breast cancer in the Danish cohort of the BIG 1-98 trial. *Ann Oncol*. 2012 May; 23(5): 1138-1144.
- Enmark E., Gustafsson J. A.: Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*, 1999 Aug; 246(2): 133-138.
- Erler J. T., Bennewith K. L., Cox T. R., Lang G., Bird D., Koong A., Le Q. T., Giaccia A. J.: Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*. 2009 Jan 6; 15(1): 35-44.
- Fidler I. J.: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun; 3(6): 453-458.

-
- Forbes J. F., Cuzick J., Buzdar A., Howell A., Tobias J. S., Baum M.; Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group: Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2008 Jan; 9(1): 45-53.
- Friedl P., Wolf K.: Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003 May; 3(5): 362-374.
- Giampieri S., Manning C., Hooper S., Jones L., Hill C. S., Sahai E.: Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009 Nov; 11(11): 1287-1296.
- Gianni L., Dafni U., Gelber R. D., Azambuja E., Muehlbauer S., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Baselga J., Jackisch C., Cameron D., Mano M., Pedrini J. L., Veronesi A., Mendiola C., Pluzanska A., Semiglazov V., Vrdoljak E., Eckart M. J., Shen Z., Skiadopoulos G., Procter M., Pritchard K. I., Piccart-Gebhart M. J., Bell R.; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team: Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011 Mar; 12(3): 236-244.
- Gupta G. P., Nguyen D. X., Chiang A. C., Bos P. D., Kim J. Y., Nadal C., Gomis R. R., Manova-Todorova K., Massagué J.: Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature.* 2007 Apr 12; 446(7137): 765-770.
- Holst F., Stahl P. R., Ruiz C., Hellwinkel O., Jehan Z., Wendland M., Lebeau A., Terracciano L., Al-Kuraya K., Jänicke F., Sauter G., Simon R.: Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet.* 2007 May; 39(5): 655-660.
- Horlings H. M., Bergamaschi A., Nordgard S. H., Kim Y. H., Han W., Noh D. Y., Salari K., Joosse S. A., Reyal F., Lingjaerde O. C., Kristensen V. N., Børresen-Dale A. L., Pollack J., van de Vijver M. J.: ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet.* 2008 Jul; 40(7): 807-8; author reply 810-812.
- Hurtado A., Holmes K. A., Geistlinger T. R., Hutcheson I. R., Nicholson R. I., Brown M., Jiang J., Howat W. J., Ali S., Carroll J. S.: Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature.* 2008 Dec 4; 456(7222): 663-666.

-
- Inumaru L. E., Silveira E. A., Naves M. M.: Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. *Cad Saude Publica*, 2011 Jul; 27(7): 1259-1270.
- Narod S. A.: Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011 Aug 2.
- Joyce J. A., Pollard J. W.: Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr; 9(4): 239-252.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., Pinkel D.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, 258: 818-821.
- Kang Y., Siegel P. M., Shu W., Drobnjak M., Kakonen S. M., Cordon-Cardo C., Guise T. A., Massagué J.: A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003 Jun; 3(6): 537-549.
- Köhler G., Bässler R.: Östrogenrezeptorstatus in Mammakarzinomen. Ergebnisse vergleichender immunhistochemischer und biochemischer Untersuchungen. *Dtsch. Med. Wochenschriften*, 1986; 1954-1960.
- Kuiper G. G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A.: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996 Jun 11; 93(12): 5925-5930.
- Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C.: Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982 Jul; 79(14): 4381-4385.
- Lao Romera J., Puertolas Hernández Tde J., Peláez Fernández I., Sampedro Gimeno T., Fernández Martínez R., Fernández Pérez I., Iranzo González Cruz V., Illarramendi Mañas J. J., Garcerá Juan S., Ciruelos Gil E. M.: Update on adjuvant hormonal treatment of early breast cancer. *Dv Ther*, 2011 Sep; 28 Suppl 6: 1-18.
- Lebeau A., Deimling D., Kaltz C., Sendelhofert A., Iff A., Luthardt B., Untch M., Löhrs U.: Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol*, 2001 Jan 15; 19(2): 354-363.
- Levental K. R., Yu H., Kass L., Lakins J. N., Egeblad M., Erler J. T., Fong S. F., Csiszar K., Giaccia A., Weninger W., Yamauchi M., Gasser D. L., Weaver V. M.: Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009 Nov 25; 139(5): 891-906.

-
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D.: A strong candidate for breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
- Minn A. J., Gupta G. P., Siegel P. M., Bos P. D., Shu W., Giri D. D., Viale A., Olshen A. B., Gerald W. L., Massagué J.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005 Jul 28; 436(7050): 518-524.
- Miyoshi Y., Murase K., Saito M., Imamura M., Oh K.: Mechanisms of estrogen receptor- α upregulation in breast cancers. *Med Mol Morphol*. 2010 Dec; 43(4): 193-196.
- Nagrath S., Sequist L. V., Maheswaran S., Bell D. W., Irimia D., Ulkus L., Smith M. R., Kwak E. L., Digumarthy S., Muzikansky A., Ryan P., Balis U. J., Tompkins R. G., Haber D. A., Toner M.: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007 Dec 20; 450(7173): 1235-1239.
- Nakazawa K., Dobashi Y., Suzuki S., Fujii H., Takeda Y., Ooi A.: Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol* 2005, 206: 356-365.
- Narayanan V., Lobachev K. S.: Intrachromosomal gene amplification triggered by hairpin-capped breaks requires homologous recombination and is independent of nonhomologous end-joining. *Cell Cycle*, 2007; 6: 1814-1818.
- Narod S. A.: Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011 Aug 2.
- Nembrot M., Quintana B., Mordoh J.: Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptor-positive human breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jan 30; 166(2): 601-607.
- Nessling M., Richter K., Schwaenen C., Roerig P., Wrobel G., Wessendorf S., Fritz B., Bentz M., Sinn H. P., Radlwimmer B., Lichter P.: Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res*. 2005 Jan 15; 65(2): 439-447.
- Omoto Y., Eguchi H., Yamamoto-Yamaguchi Y., Hayashi S.: Estrogen receptor (ER) beta1 and ER betacx/beta2 inhibit ER alpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene*, 2003 Aug 7; 22(32): 5011-5020.
- Ooi A., Inokuchi M., Harada S., Inazawa J., Tajiri R., Sawada-Kitamura S., Ikeda H., Kawashima H., Dobashi Y.: Gene amplification of ESR1 in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol*. 2011 Dec 13.

- Osborne C. K., Schiff R.: Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast*, 2003 Dec; 12(6): 362-367.
- Padua D., Zhang X. H., Wang Q., Nadal C., Gerald W. L., Gomis R. R., Massagué J.: TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008 Apr 4; 133(1): 66-77.
- Pfaffl M. W., Lange I. G., Daxenberger A., Meyer H. H.: Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS*, 2001 May; 109(5): 345-355.
- Pisani P., Parkin D. M., Bray F., Ferlay J.: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, 1999; 83: 18-29.
- Reichelt U., Duesedau P., Tsourlakis M., Quaas A., Link B. C., Schurr P. G., Kaifi J. T., Gros S. J., Yekebas E. F., Marx A., Simon R., Izbicki J. R., Sauter G.: Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* 2007, 20: 120-129.
- Reis-Filho J. S., Drury S., Lambros M. B., Marchio C., Johnson N., Natrajan R., Salter J., Levey P., Fletcher O., Peto J., Ashworth A., Dowsett M.: ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet*. 2008 Jul; 40(7): 809-810; author reply 810-812.
- Robbins P., Pinder S., de Klerk N., Dawkins H., Harvey J., Sterrett G., Ellis I., Elston C.: Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement; *Hum Pathol* 26, 1995; 873-879.
- Roberts C. G., Millar E. K., O'Toole S. A., McNeil C. M., Lehrbach G. M., Pinese M., Tobelmann P., McCloy R. A., Musgrove E. A., Sutherland R. L., Butt A. J.: Identification of PUMA as an estrogen target gene that mediates the apoptotic response to tamoxifen in human breast cancer cells and predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in breast cancer. *Oncogene*, 2011 Jul 14; 30(28): 3186-3197.
- Sauter G., Lee J., Bartlett J. M., Slamon D. J., Press M. F.: Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*, 2009 Mar 10; 27(8): 1323-1333.
- Shou J., Massarweh S., Osborne C. K., Wakeling A. E., Ali S., Weiss H., Schiff R.: Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-

- talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2004 Jun 16; 96(12): 926-935.
- Singer, C. F., Kostler, W. J., Hudelist, G.: Predicting the efficacy of trastuzumab based therapy in breast cancer: Current standards and future strategies. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1786: 105-113.
- Sjöblom T., Jones S., Wood L. D., Parsons D. W., Lin J., Barber T. D., Mandelker D., Leary R. J., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Buckhaults P., Farrell C., Meeh P., Markowitz S. D., Willis J., Dawson D., Willson J. K., Gazdar A. F., Hartigan J., Wu L., Liu C., Parmigiani G., Park B. H., Bachman K. E., Papadopoulos N., Vogelstein B., Kinzler K. W., Velculescu V. E.: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-274.
- Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., Nickolenko J., Benner A., Döhner H., Cremer T., Lichter P.: Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosom*, 1997, *Cancer* 20, 399-407.
- Stebbing J., Copson E., O'Reilly S.: Herceptin (Trastuzumab) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 2000 Aug; 26(4): 287-290.
- Tabariès S., Dong Z., Annis M. G., Omeroglu A., Pepin F., Ouellet V., Russo C., Hassanain M., Metrakos P., Diaz Z., Basik M., Bertos N., Park M., Guettier C., Adam R., Hallett M., Siegel P. M.: Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene*. 2011 Mar 17; 30(11): 1318-1328.
- Tapia C., Schraml P., Simon R., Al-Kuraya K. S., Maurer R., Mirlacher M., Novotny H., Spichtin H., Mihatsch M. J., Sauter G.: HER2 analysis in breast cancer: reduced immunoreactivity in FISH non-informative cancer biopsies. *Int J Oncol*. 2004 Dec; 25(6): 1551-1557.
- Tapia C., Savic S., Wagner U., Schönegg R., Novotny H., Grilli B., Herzog M., Barascud A. D., Zlobec I., Cathomas G., Terracciano L., Feichter G., Bubendorf L.: HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2007; 9(3): R31.
- Tavassoli F. A. a, Devilee P.: *World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of the Breast and Female Genital Organs*, 2003; 10.
- Tavassoli F. A. b, Devilee P.: *World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of the Breast and Female Genital Organs*, 2003; 18-19.

-
- Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y., Nieto M. A.: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25; 139(5): 871-890.
- Tomita S., Zhang Z., Nakano M., Ibusuki M., Kawazoe T., Yamamoto Y., Iwase H.: Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. *Cancer Sci* 2009, 100: 1012-1017.
- Valastyan S., Weinberg R. A.: Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011 Oct 14; 147(2): 280-281.
- Vincent-Salomon A., Raynal V., Lucchesi C., Gruel N., Delattre O.: ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet*. 2008 Jul; 40(7): 809; author reply 810-812.
- Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., Tanner M., Keinänen R., Palmberg C., Palotie A., Tammela T., Isola J., Kallioniemi O. P.: In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*, 1995 Apr; 9(4): 401-406.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., Bos J. L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 1988 Sep 1; 319(9): 525-532.
- Wang X., Zhang S., MacLennan G. T., Eble J. N., Lopez-Beltran A., Yang X. J., Pan C. X., Zhou H., Montironi R., Cheng L.: Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 953-957.
- Wellings S. R., Jensen H. M.: On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst*. 1973 May; 50(5): 1111-1118.
- Wood L. D., Williams Parsons D., Jones S., Lin J., Sjöblom T., Leary R. J., Shen D., Boca S. M., Barber T., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Dezso Z., Ustyanksky V., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Karchin R., Wilson P. A., Kaminker J. S., Zhang Z., Croshaw R., Willis J., Dawson D., Shipitsin M., Willson J. K. V., Sukumar S., Polyak K., Ho Park B., Pethiyagoda C. L., Krishna Pant P. V., Ballinger D. G., Sparks A. B., Hartigan J., Smith D. R., Suh E., Papadopoulos N., Buckhaults P., Markowitz S. D., Parmigiani G., Kinzler K. W., Velculescu V. E., Vogelstein B.: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318: 1108-1113.

- Wooster R., Bignell G., Lancaster J.: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
- Wyckoff J. B., Wang Y., Lin E. Y., Li J. F., Goswami S., Stanley E. R., Segall J. E., Pollard J. W., Condeelis J.: Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 2007 Mar 15; 67(6): 2649-2656.
- Zuckschwerdt W. a, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2008; 69-117.
- Zuckschwerdt W. b, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2008; 113.

7 Danksagung

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr. rer. nat. R. Simon und Prof. Dr. med. G. Sauter für die immer freundliche Betreuung und Unterstützung danken. Beide standen mir stets mit guten Ratschlägen, konstruktiver Kritik und großer Hilfsbereitschaft zur Seite.

Zu Dank verpflichtet bin ich weiterhin meinem Betreuer im Labor, Frederik Holst und dem gesamten Team der molekularpathologischen Abteilung des pathologischen Institutes des UKE.

Ein großer Dank geht auch an meine Mitdotorandin und gute Freundin, Ann-Kathrin Nottbohm, mit der ich viele Stunden im Labor, am Mikroskop und am Computer verbracht habe.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung während Studium und Dissertation sowie fürs Korrekturlesen der Arbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinem Lebensgefährten, Marc Schraub, meiner Schwester, Mimi Haas und allen Freunden bedanken, die mich durch Ratschläge und Diskussionen sowie durch ihre Motivation beim Gelingen dieser Arbeit ermuntert haben.

8 Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutz-rechtlichen Gründen.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

.....
Helen J. Haas