

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Professor Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Signifikanz der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Maja Menora Graser
Rheinfelden (Baden)

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.09.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Volkmar Müller

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	6
<i>Das Mammakarzinom.....</i>	<i>6</i>
1.1. <i>Epidemiologie.....</i>	<i>6</i>
1.2. <i>Risikofaktoren.....</i>	<i>6</i>
1.3. <i>Symptome.....</i>	<i>7</i>
1.4. <i>Diagnostik.....</i>	<i>8</i>
1.5. <i>Therapie.....</i>	<i>10</i>
1.6. <i>Prognose.....</i>	<i>11</i>
1.7. <i>Ziel der Arbeit.....</i>	<i>16</i>
2. Material und Methoden.....	17
2.1. <i>Patientenkollektiv.....</i>	<i>17</i>
2.2. <i>Tissue-Microarray-Methode.....</i>	<i>18</i>
2.3. <i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....</i>	<i>21</i>
2.4. <i>Statistik.....</i>	<i>22</i>
3. Ergebnisse.....	23
3.1. <i>Validierung der klinischen Verlaufsdaten.....</i>	<i>23</i>
3.2. <i>Technische Auswertbarkeit.....</i>	<i>24</i>
3.3. <i>FISH-Ergebnisse.....</i>	<i>24</i>
3.4. <i>16q22-Deletionen und andere molekularen Parameter.....</i>	<i>28</i>
4. Diskussion.....	30
5. Zusammenfassung.....	40
6. Abstract.....	41
7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	42
8. Literaturverzeichnis.....	43
9. Danksagung.....	58
Lebenslauf Maja Menora Graser.....	59
Eidesstattliche Erklärung.....	60

Abkürzungsverzeichnis

-	<i>bis</i>
%	<i>Prozent</i>
+	<i>Plus</i>
<	<i>unter</i>
>	<i>über</i>
a-CGH	<i>Array-based comparative genomic hybridization</i>
ADH	<i>Atypische duktale Hyperplasie</i>
AIB1, NCoA3	<i>Amplified in breast cancer 1</i>
ALCAM	<i>Activated Leukocyte cell adhesion molecule</i>
AML	<i>Akute myeloische Leukämie</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
Ass.	<i>Assoziation</i>
BAC-Klon	<i>Bakterienklon</i>
BCAT1	<i>Branched chain amino acid transaminase 1</i>
BET	<i>Brusterhaltende Therapie</i>
BLCAP	<i>Bladder cancer-associated protein</i>
BRE	<i>Bloom-Richardson-Elston-System</i>
Breast Cancer 1 und 2	<i>Breast Cancer 1 und 2</i>
CBFβ	<i>Core-binding factor beta</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
c-erb-B2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
cm	<i>Zentimeter</i>
CMF	<i>Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil</i>
cMRT	<i>Cerebrale Magnetresonanztomographie</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
D	<i>Dimensionalität</i>
DBT	<i>Digitale Brust-Tomosynthese</i>
DCIS	<i>Duktales carcinoma in situ</i>
E-Cadherin, CDH1	<i>Epitheliales Cadherin-1</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
ESR1	<i>Estrogen receptor alpha</i>
et al.	<i>Et alii (und andere)</i>
EUSOBI	<i>European Society of Breast Imaging</i>
FANCA	<i>FA complementation group A</i>
FDA	<i>Amerikanische Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung</i>
FOXP1	<i>Forkhead box P1</i>
HCC	<i>Hepatocelluläres carcinoma</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HER2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
INT2	<i>Murine mammary tumor virus integration site</i>
Ki-67	<i>Proliferativer Index</i>
KM-MRT	<i>Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LIN/CLIS	<i>Lobuläre intraepitheliale Neoplasie</i>
Lit	<i>Literatur</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LPCAT1	<i>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</i>
M1	<i>Fernmetastasen</i>
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MDM2	<i>Murine double, inute 2 homolog</i>
M-Kategorie	<i>Fernmetastasierung</i>
mRNA	<i>Messenger-Ribonucleinsäure</i>

MTCO2	Mitochondrially encoded cytochrome C oxidase II
NGS	Next Generation Sequencing
N-Kategorie	Lymphknotenstatus
NPI	Nottingham-Prognose-Index
NST	Nicht-speziieller Typ
p	Pathologisch
p chromosomal	petit=kleiner Arm eines Chromosoms
p=	Signifikanzwert
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
q chromosomal	Großer Arm eines Chromosoms
R0-Resektion	Entfernung eines Tumors im Gesunden
RBM3	RNA-binding protein 3
SETD1A	SET domain containing 1A
SIAH1	SIAH (seven in absentia homolog) E3 ubiquitin protein ligase 1
SNP	Single-NucleotidPolymorphismen
T	Tumorgröße
TCGA	The Cancer Genome Atlas
T-Kategorie	Tumorgröße
TMA	Tissue-Microarray
TUBB3	Class III β -tubulin
UDH	Usual ductal hyperplasia (gewöhnliche duktale Hyperplasie)
UGT1A1	UDP-Glucuronyltransferase 1A1
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
USA	United States of America
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
μ mol	Mikromol
χ^2 -Test	Chi-Quadrat-Test

1. Einleitung

Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste maligne Krebserkrankung und die häufigste Krebstodesursache der Frau. Insgesamt für Frauen und Männer, ist der Brustkrebs nach dem Lungenkrebs die zweithäufigste Tumorerkrankung weltweit (1).

1.1. Epidemiologie

Mit einem Anteil von 30% an allen soliden Tumoren und knapp 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland, ist Brustkrebs mit Abstand die häufigste Krebserkrankung und mit 17,5% die häufigste Krebstodesursache bei Frauen (2). Durch die Einführung des Mammographie-Screenings im Jahr 2005 sind die Erkennungsraten von Brustkrebs stark angestiegen. Die altersstandardisierte Inzidenz hat im Vergleich zu den 1980er-Jahren um 50% zugenommen (3, 4).

In Deutschland erkrankt statistisch gesehen jede 8. Frau in ihrem Leben an Brustkrebs. Bei Diagnosestellung sind 30% der Frauen jünger als 55 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren (2). Das Lebenszeitrisiko für einen Mann an Brustkrebs zu erkranken ist mit 0,1% im Vergleich zu Frauen mit 12,8% deutlich niedriger (1, 5).

Trotz steigender Inzidenz konnte sowohl die 5- als auch die 10-Jahres-Überlebensrate aufgrund von verbesserten diagnostischen Verfahren und individueller Therapie verlängert werden. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen bei 88% und bei Männern bei 77%. Die Zunahme der Inzidenz und die gleichzeitige Verbesserung der Überlebensrate führt zu einem Prävalenzanstieg. Dies trifft vor allem auf die Altersgruppe zwischen 50-69 Jahren zu, da diese Zielgruppe durch das Mammographie-Screening erfasst wird (2).

1.2. Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt.

Brustkrebs kann genetisch bedingt sein und eine positive Familienanamnese steigert das Erkrankungsrisiko um das 2- bis 9-fache (1-3, 6). Eine familiäre Belastung liegt in 5-10% aller Brustkrebserkrankungen vor und die häufigsten Genmutationen liegen in den Tumorsuppressor-Genen Breast Cancer 1 und 2 (BRCA1 und 2) oder im PTEN-Gen (Cowden-Syndrom) (7, 8). Ein weiterer Risikofaktor ist ein bereits diagnostiziertes Mammakarzinom der Gegenseite. Für diese Patientinnen ist das Risiko, ein Mammakarzinom der anderen Brust zu entwickeln, etwa doppelt so hoch als das Brustkrebsrisiko der Gesamtbevölkerung (3, 6, 9).

Neben hereditären Faktoren haben Umweltfaktoren und hormonelle Einflüsse einen großen Stellenwert. Bei einer frühen Menarche und/oder einer späten Menopause entsteht ein langer aktiver Hormonhaushalt, welcher die Entstehung von Brustkrebs begünstigen kann. Zusätzlich können das Fehlen von Geburten oder eine späte erste Geburt, sowie das Fehlen von einer Stillzeit, das Brustkrebsrisiko steigern. Eine Hormonersatztherapie, zum

Beispiel (z.B.) aus einer Kombination von Östrogen und Gestagen in der Postmenopause, sind mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Adipositas, Bewegungsmangel, Alkohol-Abusus und Nikotinkonsum führen ebenfalls zu einem nennenswerten Risikoanstieg (3, 10-12). Tamimi et al. beschreiben, dass ein Drittel der postmenopausal auftretenden Krebserkrankungen in den United States of America (USA) durch beeinflussbare Risikofaktoren ausgelöst werden und daher vermeidbar wären (13). Des Weiteren können chemische oder physikalische Einflüsse auf das Brustdrüsenepithel einwirken. Daraus können sich zunächst gutartige Veränderungen der Brustdrüse bilden, wie z.B. die gewöhnliche duktale Hyperplasie (UDH), die atypische duktale Hyperplasie (ADH), das duktale carcinoma in situ (DCIS) und die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN/LCIS), welche im Verlauf maligne entarten können (14, 15).

1.3. Symptome

Beschwerden beim Mammakarzinom treten meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf und können sich auf verschiedene Art präsentieren. Am häufigsten wird ein Knoten in der Brust getastet. Bei einem gut tastbaren Knoten kann differenziert werden zwischen einem glatt begrenzten, gut verschieblichen, derben Knoten, wie es z.B. bei einem benignen Tumor wie dem Fibroadenom vorkommt oder einen eher unscharf begrenzten, nicht verschieblichen Knoten mit eventuell weiteren Symptomen, welcher auf ein malignes Geschehen hindeuten kann (16). Lokale Veränderungen der Haut können Hauteinziehungen, Hautödeme, Orangenhaut (Peau d'orange), Exulzeration und Rötungen bis zur Entzündung der Haut, wie z.B. beim inflammatorischen Mammakarzinom sein. Es kann zu Mamillenretraktion, Mamillentrübung und zu verdächtigem Sekretabgang aus der Mamille kommen. Die Brust kann sich asymmetrisch durch das Tumorwachstum oder durch Verhärtung formverändern und vergrößern. Auch die Lymphknoten im axillären und supraklavikulären Lymphabflußgebiet können an Größe zunehmen und verhärten. Symptome können auch außerhalb der Brust auftreten, wie Rückenschmerzen und Gewichtsverlust (17). Bei Diagnosestellung und im Verlauf der Therapie können weitere Beschwerden auftreten wie Fatigue, Depression, Schlafstörung, Konzentrationsschwäche (18).

Im späteren Stadium können Symptome durch Organmetastasierung auftreten oder sich auch als die ersten bemerkbaren Symptome präsentieren. Die Metastasierung läuft lymphogen und hämatogen ab (19). Bei der lymphogenen Metastasierung werden zuerst die regionalen ipsilateralen axillären Lymphknoten infiltriert. Durch die Lokalisation des Musculus pectoralis minor kann dies in drei Level eingeteilt werden. Level 1 befindet sich lateral, Level 2 im Bereich und Level 3 medial des Musculus pectoralis minor. Zu Level 3 zählen auch ipsilaterale infraklavikuläre und supraklavikuläre Lymphknoten. Weitere entfernte Lymphknoten werden als Fernmetastasen (M1) gewertet (20). Eine hämatogene Streuung (M1) tritt am häufigsten im Skelettsystem (51%), in der Lunge (17%), im Gehirn (16%) und in der Leber (6%) auf (21).

1.4. Diagnostik

Ziel der Sekundärprävention ist es, das Mammakarzinom in einem möglichst frühzeitigen Stadium zu erkennen und eine Therapie einzuleiten. Diese frühdiagnostische Maßnahme sorgt für eine Senkung der Mortalität (22, 23). Die Früherkennung durch ein Abtasten der Brust mitsamt regionaler Lymphknoten beim Frauenarzt beginnt in Deutschland mit 30 Jahren.

Bei Auffälligkeiten wird unter dem 40. Lebensjahr eine Sonographie und gegebenenfalls eine sonographisch gesteuerte Stanzbiopsie oder Vakuumbiopsie zur histologischen Sicherung durchgeführt. Bei nicht eindeutigem Ergebnis folgt wie auch bei Frauen ab 40 Jahren eine Mammographie. Wenn noch nicht durchgeführt, kann eine Sonographie bei eingeschränkter Beurteilbarkeit der Mammographie ergänzend helfen, gefolgt von einer Untersuchung mittels Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie (KM-MRT) bei weiterhin fraglichem Befund. Zusätzlich sollte bei einer auffälligen Sekretion aus der Mamille eine Galaktographie durchgeführt werden. Folgende Empfehlungen sind den deutschen Leitlinien zu entnehmen, welche auf der aktuellen Studienlage basiert (24). In einem systemischem Review von 2016 in den USA wurde die Bedeutung der Sekundärprävention erneut validiert (25).

Eine Stanzbiopsie ist wichtig für die histologische Sicherung des Tumors und kann bereits Informationen über den Tumortyp, das Grading, den Hormonstatus, den human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)-Status und den proliferativen Index (Ki-67) geben (26).

Aufgrund einer Nutzen-Risiko-Abwägung empfiehlt sich für die Altersgruppe 40-49 Jahre eine individuelle Risikoanalyse bezüglich einer frühzeitigen Mammographie (25, 27). Dies ist darauf zurückzuführen, dass zum einen die Mortalitätsreduktion durch die Mammographie für Frauen zwischen 40 und 49 Jahren niedriger ist als für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren und zum anderen in der Altersgruppe 40-49 Jahre häufiger falsch-positive und falsch-negative Befunde zu verzeichnen sind. In Deutschland wird das Mammographie-Screening erst für die Altersgruppe 50-69 Jahren empfohlen. Für Männer gelten diese Empfehlungen nicht (2, 28). Darüber hinaus wird, ähnlich wie in der amerikanischen Leitlinie, ein Screening ab 70 Jahren angeboten (22). Eine relative Risikoreduktion bei regelmäßigen Screenings von 15-20% konnte beobachtet werden (27, 29). Das intensive Screening kann gegebenenfalls zu einer Überdiagnostizierung führen, bei welcher invasive und nicht-invasive Brustkrebsformen diagnostiziert und behandelt werden, welche während des Lebens nicht klinisch aufgefallen wären. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einem diagnostizierten Brustkrebs um eine Überdiagnose handelt, liegt circa bei 30% (27). Ein vielversprechendes Verfahren aufgrund eines Sensitivitätsgewinns und einer guten Spezifität könnte die digitale Brust-Tomosynthese (DBT) für zukünftige Routineverfahren sein, welche eine Mammographie in 2-Dimensionalität (D) und 3D darstellt. Die European Society of Breast Imaging (EUSOBI) nennt die DBT ein Verfahren zur verbesserten Krebserkennung und für eine Verringerung der Rückrufrate. Außerdem soll es durch Nutzung dieser neueren Methode zu einem Rückgang von Intervallkarzinomen kommen, einer auftretenden Krebserkrankung innerhalb von 12 Monaten nach einem unauffälligen Mammographie-Screening (30, 31).

Falls ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt oder ein erhöhtes Fernmetastasierungsrisiko besteht, wie beispielsweise bei Lymphknotenmetastasen, einer Tumorgroße über 2 cm (>T2), einer aggressiven Tumorbiologie, wie bei dem Triple-negativen oder HER2/neu-positiven Mammakarzinom, sollte die Suche nach Metastasierung begonnen werden. Dies wird mithilfe eines bildgebenden Ganzkörperstaging von Knochen, Lunge und Leber mittels Computertomographie (CT) von Thorax und Abdomen durchgeführt und durch Sonographie und Skelettszintigraphie ergänzt (32). Ein Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-CT kann zusätzlich bei Unklarheiten durchgeführt werden und bei einem Verdacht auf Metastasen im zentralen Nervensystem wird die cerebrale Magnetresonanztomographie (cMRT) noch in das Staging mit aufgenommen (33).

1.5. Therapie

Ziel der chirurgischen Therapie ist bei einem nicht fortgeschrittenen Mammakarzinom die Entfernung im Gesunden mit tumorfreien Resektionsrändern (R0). Dabei wird, wenn möglich, eine brusterhaltende Therapie (BET) angestrebt mit anschließender Bestrahlung, da eine alleinige Mastektomie keinen Überlebensvorteil bietet (34, 35). Eine postoperative Bestrahlung nach einer BET senkt die Rezidivrate und die Mortalität (36, 37). Eine Mastektomie ist indiziert bei ansonsten nicht resezierbarem Tumor, ungünstigem Tumor-Brust-Verhältnis, inflammatorischem Mammakarzinom, bei Kontraindikation der Bestrahlung oder Patientenwunsch nach ausführlicher Aufklärung (38).

Durch die sekundäre Prävention können Tumore der Brust bereits in einem frühen Tumorstadium diagnostiziert werden. Dadurch werden auch weniger radikale Therapieansätze möglich, wie z.B. eine Sentinellymphknoten-Entfernung für das axilläre Staging (39).

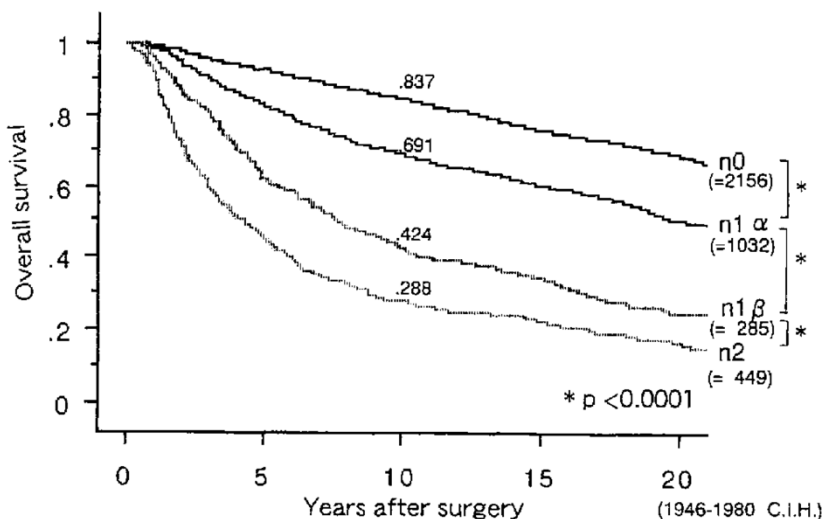
Eine neoadjuvante Therapie wurde erstmalig durchgeführt bei Patientinnen, welche unter einem fortgeschrittenen, nicht resezierbaren oder auch inflammatorischen Brustkrebs litten, der durch diese Chemotherapie „schrumpfte“ und dann chirurgisch entfernt werden konnte. Die damit einhergehende Möglichkeit einer Entfernung des Tumors im Gesunden (R0-Resektion) verbessert die Prognose (40-42). Auch die adjuvante Therapie hat das Ziel die Prognose des Patienten zu verbessern und die rezidivfreie Zeit zu verlängern (43). Die neoadjuvante und die adjuvante Therapie kann sowohl aus Radiotherapie als auch aus systemischer Therapie bestehen. Bei einer systemischen Therapie kann, je nach Patientenprofil, zwischen einer Chemotherapie, einer Antikörpertherapie und einer Antihormontherapie gewählt werden (44).

Für das Mammakarzinom existieren diverse prognostische und prädiktive Faktoren (siehe Absatz 1.6), anhand derer die Patientinnen stratifiziert werden können. Durch die interdisziplinäre Besprechung der Patientinnen mit der Diagnose Brustkrebs in einem Tumorboard, wird ein individuelles Behandlungskonzept nach aktuellen Standards und Literaturergebnissen auf den Patienten zugeschnitten. Dies hat das Ziel, die Überlebenszeit, aber auch die Lebensqualität zu verbessern, da eine aggressive Tumorbekämpfung auch mit vielen Nebenwirkungen einhergeht. Neben der akuten Toxizität, wie z.B. starke Übelkeit, Erbrechen, Alopezie und Fatigue während einer Chemotherapie, sind auch lebensbedrohliche Langzeitschäden wie eine schwere Herzinsuffizienz oder Leukämie zu beobachten. Dabei wird die Lebensqualität massiv in Mitleidenschaft gezogen (45).

1.6. Prognose

Prognosefaktoren korrelieren, unabhängig von der Therapie, mit dem Verlauf einer Erkrankung, z.B. mit der Überlebensrate, dem Rezidivauftreten und der Metastasierung. Ein prädiktiver Faktor hingegen kann das Ansprechen und somit die Wirksamkeit einer bestimmten Therapie beeinflussen. Eine adjuvante Chemotherapie erzielt bei einem Teil der Patientinnen mit Mammakarzinom eine lebensverlängernde Wirkung, allerdings auf Kosten einer teilweise nicht unerheblichen Morbidität. Es ist deswegen von großer Bedeutung, die Indikationsstellung zur adjuvanten Therapie optimal zu gestalten. Hierfür bedarf es einer bestmöglichen Einschätzung des Aggressionspotentials eines Tumors, beziehungsweise der zu erwartenden Patientenprognose. Die klassischen Prognoseparameter sind (p)T, (p)N, sowie der Differenzierungsgrad G des Tumors. Diese 3 wichtigen Prognosefaktoren wurden auch in dem Nottingham-Prognose-Index (NPI) zusammengestellt. Die Einteilung erfolgt in eine gute, mäßige und schlechte Prognose. Hierdurch können Risikopatientinnen erleichtert erfasst werden (46, 47).

Der zuverlässigste morphologische prognostische Parameter ist davon der Lymphknotenstatus (N-Kategorie). Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt bei nicht befallenen Lymphknoten 84%, im Vergleich zu 42% bei über 4 befallenen Lymphknoten (48). Zusätzlich wird unterschieden zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknoten und ob Nicht-Sentinel-Lymphknoten befallen sind, welches mit einer schlechteren Prognose einhergeht (48-51).



n0	- keine regionären Lymphknoten befallen -	10 Jahres Überlebensrate: 84%
n1 α	- Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten -	10 Jahres Überlebensrate: 70%
n1 β	- Metastasen in 4 oder mehr axillären Lymphknoten -	10 Jahres Überlebensrate: 42%
n2	- 1 oder mehr subklaviculäre Lymphknoten -	10 Jahres Überlebensrate: 29%

Abbildung 1: Überleben beim Mammakarzinom und Lymphknotenstatus (pN) (48)

Die Tumorgröße ist ein wichtiger prognostischer Faktor, da eine Größe von unter 1 cm mit einer guten Prognose einhergeht und umgekehrt das Risiko für ein Rezidiv mit dem Durchmesser des Primärtumors steigt. So hat sich in einem Beobachtungszeitraum von 30 Jahren ein Rezidivrisiko von 25% bei einer Tumorgröße von unter 2 cm gezeigt, welches bei einer Tumormasse von 4-4,9 cm auf 50% ansteigt (52). Zwischen der Größe des Primärtumors und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen, dem Malignitätsgrad des Tumors oder einem hohen Ki-67 gibt es eine signifikante positive Korrelation (53).

Der Malignitätsgrad (Grading) wurde bereits von Robert B. Greenough im Jahr 1925 als prognostischer Faktor im Zusammenhang mit dem Überleben demonstriert. Erweitert von Bloom und Richardson wurde das Grading und somit der Atypiegrad basierend auf die Ausbildung von Tubuli, dem Grad der Kernatypien und die Mitosefrequenz festgelegt (54, 55). Auch in aktuellen Studien zeigt sich, dass das Grading, unabhängig von Tumorgröße und Lymphknotenstatus, einen Effekt auf das klinische Outcome des Patienten hat (56, 57).

Der histologische Tumortyp gibt ebenfalls eine unterschiedliche Prognose vor. Zum Beispiel hat das inflammatorische Mammakarzinom, mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 2,9 Jahren, eine signifikant kürzere Überlebenszeit als lokal fortgeschrittene nicht-inflammatorische Brustkrebsformen mit 6,4 Jahren (58). Die relative 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 78% beim metaplastischen Karzinom, 85% beim Karzinom vom nicht-spezialen Typ (NST), 86% beim invasiv-lobulären Karzinom, 92% beim papillären Karzinom, 93% beim medullären Karzinom und 96% beim muzinösen Karzinom (59).

Das Alter geht in die Prognose mit ein, da besonders junge und alte Patientinnen mit einer neu aufgetretenen Brustkrebserkrankung eine kürzere Überlebensdauer aufweisen (59, 60).

Eine weitere negativer prognostischer Faktor ist eine Infiltration in Lymph- und Blutgefäße (61-64). Gerade bei Brustkrebsformen, bei denen keine Lymphknoten befallen sind und der Tumor klein ist (T1), zeigt sich bei einem Befall der Lymph- und Blutgefäße dennoch ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko und ein erhöhtes Risiko für die Bildung von Fernmetastasen (65).

Der Hormonrezeptorstatus des Tumors gibt viele Informationen über die Prognose, als auch zum Ansprechen auf eine endokrine Therapie (66-69). Zu bestimmen sind die Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR). Die Hormonrezeptoren werden immunhistochemisch mittels Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen. Bei einer auftretenden nukleären Positivität von über 10% wird der Tumor mit positivem Östrogen- beziehungsweise Progesteronstatus beschrieben (70, 71). Die prädiktive Aussagekraft wird erhöht, wenn beide Hormonrezeptoren bestimmt werden (72).

Der Her2/neu-Status ist ebenfalls ein prognostischer und auch prädiktiver Marker. Eine Amplifikation des Onkogens c-erb-B2 (Her-2/neu) führt zu einer Überexpression von

transmembranösen Glykogenrezeptoren, welche wachstumsstimulierend wirken. Dies wird in 10-34% aller Mammakarzinome nachgewiesen und geht mit einer schlechten Prognose einher. Die Therapie besteht aus einem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) gegen diesen Rezeptor (73-76).

Ki-67 ist ein Marker für die Proliferationsaktivität und markiert die in Teilung befindlichen Zellen. Mittels Ki-67-IHC wird der Prozentsatz der sich teilenden Zellen bestimmt (proliferativer Index). Ein hoher Ki-67-Labeling Index ist mit einer erhöhten Rezidivrate und verkürztem Überleben assoziiert (77).

Zusätzlich können die Invasionsfaktoren Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und dessen Inhibitor Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), welche am Abbau von Tumorstroma und Basalmembran mitwirken, untersucht werden. Die Bestimmung der tumorassoziierten Proteolysefaktoren erfolgt mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) aus dem Tumorgewebe. Die Invasion und Metastasierung des Brustkrebs wird mithilfe des uPA-Rezeptors unterstützt. Kann uPA oder PAI-1 in erhöhter Konzentration im Primärtumor nachgewiesen werden, steigt das Metastasierungsrisiko und die Gesamtüberlebenszeit sinkt. So kann bei Patientinnen mit fehlendem Lymphknotenbefall, positivem Hormonrezeptorstatus, negativem Her2/neu-Status und zusätzlich niedriger uPA oder PAI-1 Konzentration eine bessere Prognose erwartet werden, was die Überlegung rechtfertigt, ob bei diesen Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie einen zusätzlichen Nutzen mit sich bringt (78, 79).

Zahlreiche andere molekulare Parameter wurden in der Literatur als prognoserelevant beim Mammakarzinom beschrieben. Dazu gehören beispielsweise Kirsten rat sarcoma viral oncogene (KRAS) messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Expression (80), BRCA1/2-Mutation (81), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR1) Expression (82), lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 Expression (LPCAT1) (83), Phosphatase und Tensin homolog (PTEN) Deletion (84), 8p-Deletion (85, 86), siehe zusätzlich aufgelistete prognoserelevante Deletionen in Tabelle 1, Amplifizierung von c-MYC bei 8q (87), murine mammary tumor virus integration site (INT2) und HSTF1 bei 11q13 (88), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (89), EBF4 und HRASLS (90), Auftreten von Single Nucleotid Polymorphismen (SNP) wie UDP-Glucuronyltransferase 1A1 (UGT1A1), Cytochrom P2B6, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1), HCN1 und ABCB1 (91). Von besonderer praktischer Bedeutung sind heute kommerzielle, teilweise von der Amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassene Prognosetests, welche gleichzeitig eine Vielzahl von Genen auf der RNA Ebene untersuchen. Zu diesen Tests gehören MammaPrint® (70 Gene), OncoType DX® (21 Gene) und EndoPredict® (11 Gene), welche alle bei bestimmten Situationen von Klinikern angefordert werden. Diese Testverfahren beruhen auf, vor mehr als 15 Jahren erhobenen, RNA-Expressionsdaten von verhältnismäßig kleinen Patientenkollektiven (92-98). Der Nachteil dieser Verfahren ist, dass ihre Ergebnisse vom Reinheitsgrad des Tumors und der Art der Beimischung nicht-neoplastischer Zellen abhängig sind (99). Die Methoden basieren auf der Quantifizierung tumorrelevanter RNAs, welche allerdings auch in Normalgewebe oder in Entzündungszellen exprimiert werden können. Es ist

davon auszugehen, dass diese RNA basierten Tests bald abgelöst werden von moderneren Verfahren, welche sich beispielsweise Techniken wie Next-Generation-Sequenzierung (NGS) bedienen und insbesondere beim Nachweis von Mutationen reproduzierbarere Ergebnisse liefern werden. Da die Reproduzierbarkeit molekularer Tests ein wichtiger Faktor ist, stellt auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eine potentiell nützliche Methode zur Evaluation von Prognosefaktoren dar. Frühere Studien am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) hatten gezeigt, dass der Nachweis von Deletionen beim Prostatakarzinom, wie die Deletion von PTEN (100, 101), 13q (102), 16q und 6q (103, 104), 12p (105), 8p (106), 18q (107) und die Kodeletion von 16q23, PTEN (108), 3p13 (109, 110), aber auch beim Mammakarzinom erhebliche prognostische Bedeutung besitzt. Beim Mammakarzinom wurde dies für Deletionen von 8p (85) und 10q23 mit PTEN (84) gezeigt. Eine Zusammenfassung von Studien zur Prognoserelevanz von Deletionen ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Prognoserelevanz von Deletionen beim Mammakarzinom

Studie Erstautor	Jahr	Deletion	Anzahl (n)	p-Wert bei schlechter Prognose	Lit.
Ragnarsson et al.	1996	1p	232	p=0.021 [3]	(111)
Ragnarsson et al.	1999	1p	238	p<0.001 [3]	(112)
Janssen et al.	2003	1p & 16q	76	p=0.95 [3]	(113)
Janssen et al.	2009	1p31	158	p=0.97 [2]	(114)
Borg et al.	1992	1q21 (PEM)	124	p=0.059 [1]	(115)
Seute et al.	2001	6q	44	p=0.041 [1] [4]	(116)
Bièche et al.	1992	7q31	245	p=0.0036 [3] ; p = 0.00022 [2]	(117)
Kristjansson et al.	1997	7q21-35	238	Nicht signifikant [3]	(118)
Lebok et al.	2015	8p	2197	p<0.0001 [3]	(85)
Sigbjörnsdottir et al.	2000	8p	201	p=0.012 [3]	(86)
Eiriksdottir et al.	1995	9p	201	p=0.236 [3]	(119)
Lebok et al.	2016	9p21	2197	p=0.0720 [3]	(120)
Lebok et al.	2015	10q	2197	p=0.0090 [3]	(84)
Dellas et al.	2002	11p	40	p<0.002 [3]	(121)
Climent et al.	2007	11q	185	p<0.0001 [1] ; Nicht signifikant [3]	(122)
Winqvist et al.	1995	11q23	96	p=0.0004 [3]	(123)
Eiriksdottir et al.	1998	13q12-13	139	p<0.001 [1]	(124)
Seute et al.	2001	13q	44	p=0.034 [1]	(116)
Andersen et al.	1992	13q	59	Nicht signifikant [3]	(125)
siehe Tabelle zu 16q		16q		[4] siehe Tabelle 8	
Andersen et al.	1992	17p	59	Nicht signifikant [3]	(125)
Thompson et al.	1998	17p13 (imbalance)	91	p=0.008 [1] ,p=0.08 [3]	(126)
Nedelcheva Kristensen et al.	1998	17p (GSTM1)	239	p=0.036 [3]	(127)
Nagai et al.	1994	17p (D17S5)	67	p=0.007 [1]	(128)
Nagai et al.	1995	17p (D17S5)	105	p=0.002 [1]/[3]	(129)
Nagai et al.	1995	17p (tp53)	105	p=0.35 [1]/[3]	(129)
Nagai et al.	1995	17q (D17S250-THRA1)	105	p=0.81 [1]/[3]	(129)
Nagai et al.	1995	17q (D17S776-D17S579)	105	p=0.74 [1]/[3]	(129)
Nagai et al.	1995	17q (distal D17S733)	105	p=0.89 [1]/[3]	(129)
Andersen et al.	1992	17q	59	Nicht signifikant [3]	(125)
Climent et al.	2002	18p	34	p=0.003 univariate, p=0.006 multivariate [1]	(130)
Dellas et al.	2002	18q	40	p<0.004 [3]	(121)
		[1]relapse-free survival = disease-free survival [2]metastasis-free survival [3] overall survival		[4] gute Prognose (Eine Ausnahme und damit eine signifikant gute Prognose liegt bei 16q und 6q vor)	

Die Region 16q22 ist eine weitere beim Mammakarzinom häufig deletierte Region, wobei die Deletionen meistens sehr groß sind und häufig auch den gesamten langen Arm betreffen. 16q-Deletionen sind bei verschiedenen Tumorarten hochsignifikant mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (103, 108, 131-140). Beim Mammakarzinom sind die diesbezüglichen Daten allerdings anders. Mehrere Studien hatten eine signifikant bessere Prognose bei 16q deletierten Tumoren als bei nicht deletierten Tumoren gezeigt (116, 141-145). Allerdings variiert die Zahl der nachgewiesenen Deletionen innerhalb von diesen Studien teils erheblich und die verwendeten Methoden wie loss of heterozygosity (LOH) (141, 146-150) und array-comparative genomic hybridization (a-CGH) (99, 116, 142-144) sind fehleranfällig. Bisher wurden beim Mammakarzinom nur wenige FISH-Studien zum Nachweis von 16q22-Deletionen durchgeführt. Eine Studie umfasste nur 46 Fälle ohne Prognosedaten. Hierbei wurde die q/p-Ratio für Chromosom 16 untersucht, um die Anzahl der Kopienveränderungen der beiden Chromosomenarme (q= großer Arm, p=kleiner Arm) unabhängig von allgemeinen Veränderungen in der Ploidität der Tumorzellen zu untersuchen. Dabei zeigte sich bei Low-grade-Tumoren eine höhere Tendenz für einen Verlust von 16q (151).

Eine andere Studie untersuchte mittels FISH Zelllinien bei 21 Brustkrebspatientinnen, jedoch ohne Angabe von Prognose oder Prozentsatz der Deletion (152). Eine Studie zur Untersuchung von Alterationen von Chromosom 1 und 16 wurde an 26 papillären Brustkrebsformen mittels multicolor FISH durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Deletionshäufigkeit bei intracystischen papillären Mammakarzinomen von Grad 1 (153). In einer weiteren Studie wurden n=18 Proben mit einer bereits nachgewiesenen 16q-Deletion in der LOH-Analyse nochmalig mit der FISH-Analyse untersucht. Interessanterweise zeigte sich in der FISH-Analyse lediglich bei n=9 (38.9%) dieser Proben ein tatsächlicher Nachweis einer 16q-Deletion (147). Die FISH-Methode ist der Goldstandard für die Untersuchung von quantitativen Genomveränderungen, da eine präzise Quantifizierung von Genen und Chromosomen auf Einzelzellniveau möglich ist und Verunreinigung durch nicht-neoplastische Zellen mit einer visuellen Kontrolle ausgeschlossen werden (154-156).

1.7. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die prognostische Bedeutung der 16q22-Deletion an einem großen Patientenkollektiv mittels der „Goldstandard“-Methode Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu klären. Dazu wurde ein Tissue-Microarray (TMA) mit insgesamt 2.222 Mammakarzinomen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Der TMA beinhaltet 2.517 Brustdrüsengewebe. 2.222 Gewebe sind Mammakarzinome und 295 Gewebe normales Brustdrüsengewebe oder präkarzinöses Brustdrüsengewebe. Diese wurden im Zeitraum von 1985 bis 1999 an der Universitätsklinik Basel und an dem Stadtspital Triemli in Zürich operiert. Die wesentlichen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt. Alle Tumoren wurden nach dem pTNM-System klassifiziert, der histologische Grad wurde nach dem Bloom-Richardson-Elston System (BRE) festgelegt und der Tumortyp nach der WHO Klassifikation (WHO 2012) definiert. Lymphknoten waren bei 1.867 der 2.222 Patientinnen gleichzeitig zur Untersuchung des Primarius entnommen worden. Verlaufsdaten standen von 1.982 der 2.222 Patientinnen zur Verfügung. Das mediane Alter betrug 62 Jahre (zwischen 26 - 101 Jahre). Die mittlere Nachbeobachtungszeit war 68 Monate. Die minimale Nachbeobachtungszeit betrug 1 Monat, die maximale betrug 176 Monate. Daten zu allfälligen adjuvanten Chemotherapien oder Radiotherapien standen nicht zur Verfügung.

Tabelle 2: Patientenkollektiv des verwendeten Tissue-Microarrays

	Patientenkollektiv auf dem TMA	
	n	Auswertbar n
Alle Proben auf dem TMA	2517	1965
Histologische Einteilung		
Invasives Karzinom vom Nicht-spezialen Typ (NST)	1552	1228
invasiv lobuläres Karzinom	312	253
medulläres Karzinom	58	52
kribriiformes Karzinom	65	46
muzinöses Karzinom	69	59
tubuläres Karzinom	56	40
papilläres Karzinom	30	25
apokrines Karzinom	15	13
andere Subtypen	43	37
unbekannt	22	13
insgesamt	2222	1766
BRE Grad		
1	579	442
2	929	744
3	714	579
Tumorstatus		
pT1	823	611
pT2	1023	831
pT3	124	108
pT4	242	207
Nodalstatus		
pN0	952	741
pN1	794	640
pN2	121	103
Hormonstatus		
ER negativ	474	296
ER positiv	1544	905
PR negativ	1265	743
PR positiv	661	414

2.2. Tissue-Microarray-Methode

Die Tissue-Microarray-Methode erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten Tumoren auf einem einzigen Objektträger. Grundlage für die Herstellung eines TMA ist das Vorhandensein eines tumorhaltigen Spenderblocks, aus dem mit einer Hohlzylinder 0,6 mm in Durchmesser messender Gewebezylinder entnommen wird. Der entnommene Gewebezylinder wird danach in einen TMA-„Empfängerblock“ eingelagert, wo an vordefinierten Koordinaten zuvor Löcher angefertigt wurden. Jeder entnommene Gewebezylinder wird in ein vorher bestimmtes Loch im Empfängerblock deponiert. Zur sicheren Orientierung werden TMA grundsätzlich asymmetrisch und mit unterschiedlich großen Sektoren aufgebaut. Abbildung 2 zeigt die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf typischerweise verwendete Organisationsstruktur eines TMA-Blocks. Die gut 600 Proben, welche in einem TMA eingebracht werden, werden in 6 unterschiedlich große Sektoren aufgeteilt. Die 6 Sektoren werden mit Großbuchstaben (A-F) definiert, die Zeilen mit Zahlen und die Spalten mit Kleinbuchstaben.

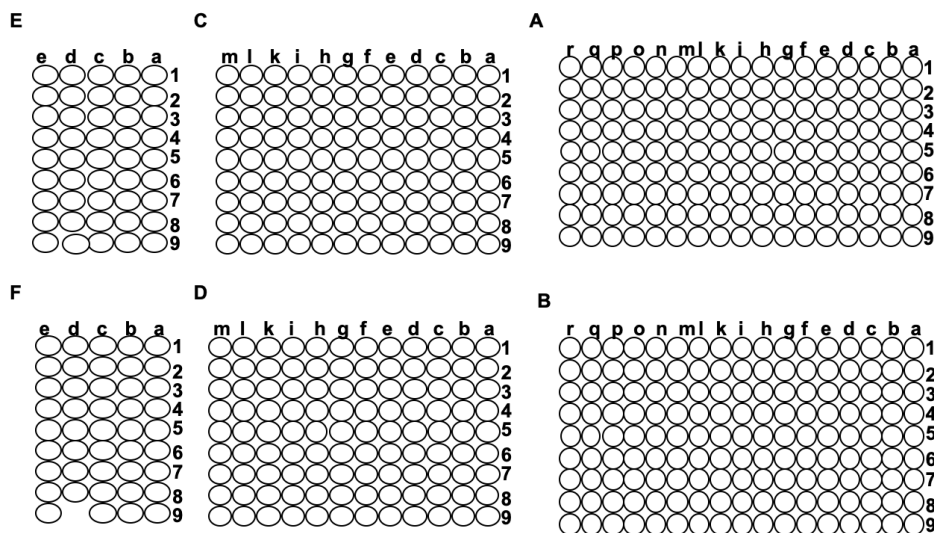


Abbildung 2: TMA – Aufbau (UKE)

Das Tissue-Microarray-Verfahren ist besonders geeignet für die Pseudonymisierung oder Anonymisierung von Gewebematerialien für Forschungszwecke. Potentiell patientenidentifizierende Biopsienummung, welche auf Gewebeproben normalerweise sichtbar sind, werden nur während der Herstellungsphase eines TMA benötigt. Danach läuft die Identifikation der einzelnen Tumoren allein über das TMA-Koordinatensystem. Die während der Herstellungsphase verwendete Biopsienummung oder andere Patientenidentifizierungscharakteristika, können danach entweder ausgeblendet werden (Pseudonymisierung) oder werden definitiv gelöscht (Anonymisierung). Ein Ausschnitt aus der Nachanonymisierung entstandenen Datenfiles ist in Tabelle 3 dargestellt. Hier sind die Patienten durch die Koordinate und das Alter definiert. Dazu kommen Informationen zu histologischem Typ, BRE Grad, pT, pN, Überlebenszeit in Monaten sowie molekulare Daten. Für die vorliegende Untersuchung standen Daten zu Deletionen von 6q15, 8p21, 9p21, 10q23, 11q23, 13q14, und 17p13, Amplifikationen von cMYC, Cyclin D1 (CCND1), Murine Double Minute 2 homolog (MDM2), sowie die Expression von Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und Her2/neu zur Verfügung.

Tabelle 3: Ausschnitt eines anonymisierten TMA-Datenfiles

TMA-Blocknummer	Koordinaten	Histotyp	Alter	BRE-Grad	pT	pN	Überleben (Monate)	16q22-Deletion vs. normal
A	A 10a	NST	39	2	2	1	120	normal
A	A 10c	NST	75	3	2	0	113	Deletion
A	A 10e	NST	80	/	4	2	59	normal
A	A 11g	NST	58	1	2	0	99	normal
A	A 12f	medulläres Karzinom	64	3	2	0	100	normal
A	A 18d	NST	41	3	2	1	55	Deletion
A	A 19d	muzinöses Karzinom	68	2	1	0	101	normal
A	A 19h	NST	58	2	2	1	99	normal
A	A 19i	NST	56	2	2	1	89	normal
A	A 20f	NST	56	/	1	0	111	normal
A	A 2f	NST	65	3	1	0	133	Deletion
A	A 2h	medulläres Karzinom	56	3	/	0	139	Deletion
A	A 5d	lobuläres Karzinom	38	/	2	1	138	normal

Der bereits früher hergestellte TMA enthielt Proben von insgesamt 2.222 Tumoren, welche auf 6 TMA Blöcke verteilt wurden und Karzinome vom nicht-spezialen Typ (NST), lobuläre, medulläre, kribriforme, muzinöse, tubuläre, papilläre, apokrine Karzinome, sowie Karzinome mit duktalem, lobulären und tubulären Merkmalen und andere seltene Tumorformen enthielten. Alle TMA-Blöcke enthielten zusätzlich eine Standardkontrollsektion mit Normalgewebe von Brust, Niere, Nebenniere, Magen, Dickdarm, Endometrium, Nebenhoden, Herz, Niere, Lunge, Pankreas, Parotis, Plazenta, Prostata, Haut, Milz, quergestreifte Muskulatur, Schilddrüse und Thymus. Die 6 TMA Blöcke sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Abbildung 4 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbten Schnittbildes von Array-Block A. Abbildung 5 zeigt eine Detailaufnahme von 4 Mammakarzinomen bei stärkerer Vergrößerung.



Abbildung 3: Das Patientenkollektiv bestehend aus 6 TMA-Blöcken

Abbildung 4: Übersichtsaufnahme eines HE Schnittes von Array-Block A

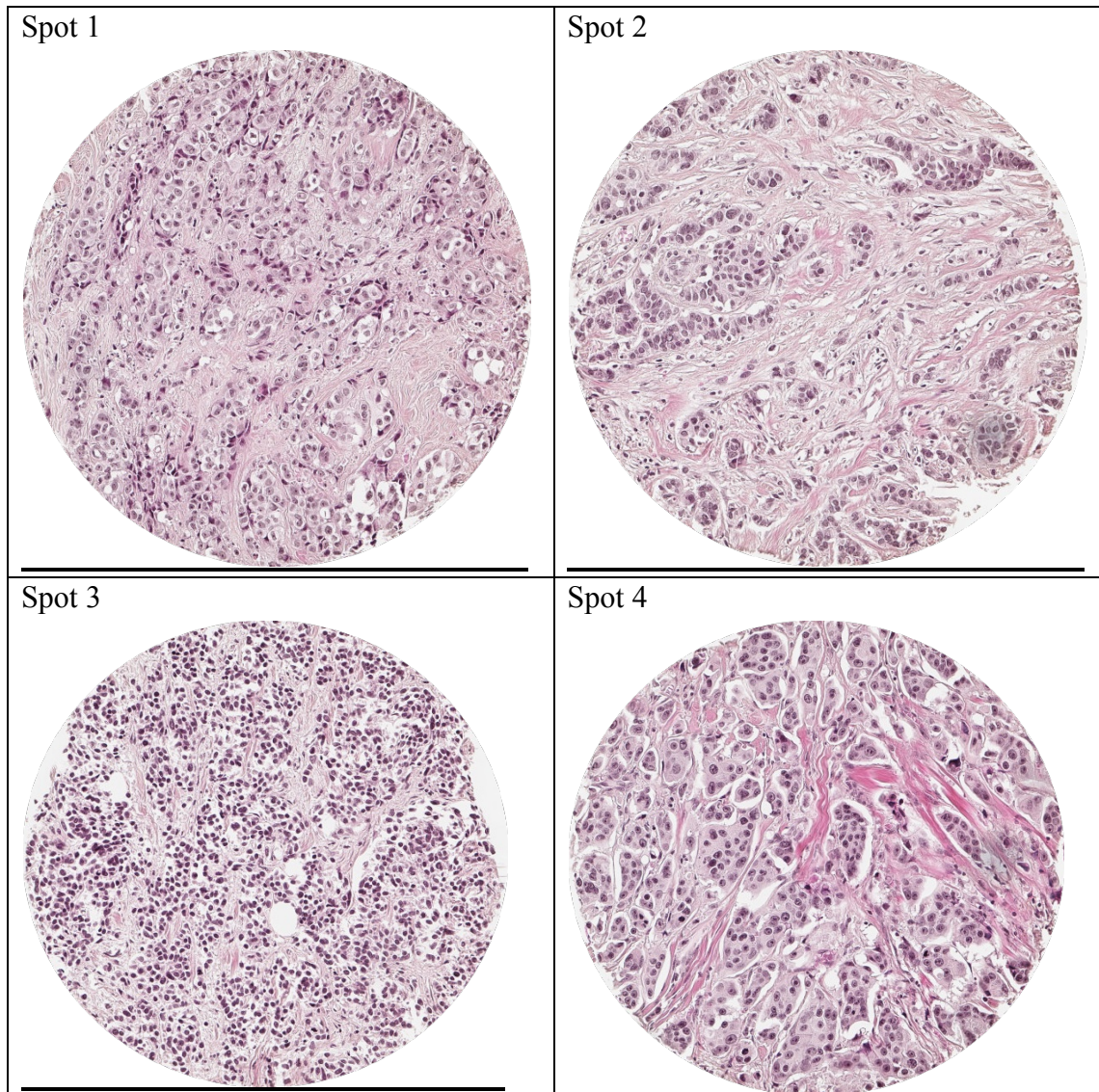


Abbildung 5: Detailaufnahme von 4 Mammakarzinomen bei stärkerer Vergrößerung

Klinisch pathologische Daten zu Abbildung 5:

Spot 1 (Koordinate B11G):	tubuläres Karzinom; pT2; pN2; BRE Grad 1; Alter 68 Jahre
Spot 2 (Koordinate B10G):	NST; pT1; pN0; BRE Grad keine Angabe; Alter 57 Jahre
Spot 3 (Koordinate B9C):	NST; pT2; pN0; BRE Grad 3; Alter 50 Jahre
Spot 4 (Koordinate A11I):	NST, pT3; N2; BRE Grad 3; Alter 65 Jahre

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

Für die FISH-Untersuchung wurden frisch hergestellte 2.5 µm dicke Schnitte der TMA-Blöcke verwendet. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit einer proteolytischen Lösung wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt (Paraffin-Pretreatment-Reagent Kit, Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Die TMA-Schnitte wurden danach deparaffinisiert, luftgetrocknet und in einer aufsteigenden Alkohollösung (70%, 85%, 100%) dehydriert.

Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten bei 74°C in 70% Formamid 2XSSC-Lösung denaturiert.

Die für die Region 16q22 ausgewählte FISH-Sonde wurde selbst hergestellt aus zwei Bakterienklonen (BAC-Klon 1 = RP11-401A12 und BAC-Klon 2 = RP11-470N03). Diese FISH-Sonde war ausgewählt worden, weil sie zentral an die beim Mammakarzinom bekannte 16q22-Deletionsregion komplementär bindet.

Die Zentromersonde ist eine Referenzsonde und bindet an die Stelle 16q11.2, CEP16 (D16Z3). Dies ist eine kommerzielle Zentromer-16-Probe (Katalog Nummer #05J10-016 Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Für die FISH-Untersuchung wurde eine Doppelfluoreszenzmarkierung gewählt. Die 16q22-Probe wurde Spektrum-Orange markiert und zusammen mit der Spektrum-Grün markierten Referenzsonde hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte gewaschen und mit 0.2 µmol 4',6-Diamidin-2-phenylindol in einer „Antifade“-Lösung gegengefärbt. Die gefärbten Präparate wurden unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskopes manuell interpretiert und für jedes Präparat wurden die Zentromer-16- und 16q22-Kopienzahl für die prädominante Population registriert. Eine 16q22-Deletion wurde dann diagnostiziert, wenn sich in mindestens 60% der Tumorzellen weniger 16q22- als Zentromer-16-Signale fanden. Beispiele einer 16q22-Deletion sind in Abbildung 6 dargestellt. Tumoren ohne 16q22-Deletion sind in Abbildung 7 gezeigt. Ein vollständiges Fehlen von 16q22-Signalen in Tumorzellen wurde dann als homozygote 16q22-Deletion bewertet, wenn in benachbartem Normalgewebe eindeutige 16q22-Signale sichtbar waren. Tumoren, welche keine auswertbaren 16q22-Signale zeigten, weder in Tumorzellen noch in Normalzellen, wurden wegen insuffizienter Hybridisierung von der Untersuchung ausgeschlossen. Die für diese Studie ausgewählten Schwellenwerte zur Definition von heterozygoten und homozygoten Deletionen basierten auf einer früheren Untersuchung, wo unter Verwendung dieser Kriterien für Deletion von PTEN eine 100 prozentige Konkordanz mit Array-CGH-Daten erzielt werden konnte (101).

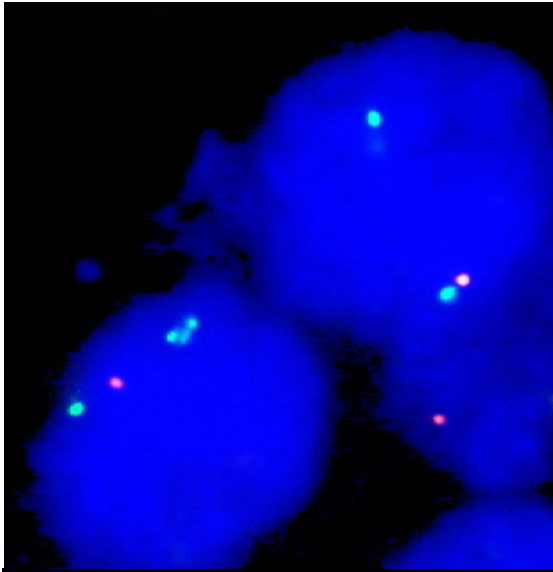


Abbildung 6: FISH-Tumorpräparat mit 16q22-Deletion

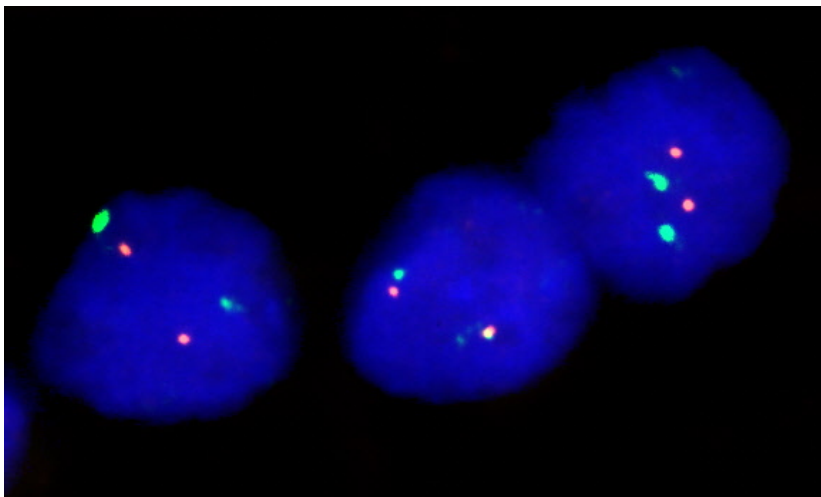


Abbildung 7: FISH-Tumorpräparat ohne 16q22-Deletion

2.4. Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem JMP-9 Programm (SAS-Institut incorporated, North Carolina, USA) durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) oder ein Mehrfeldertest wurde zur Untersuchung der Beziehung zwischen 16q22-Deletionen und kategorischen Variablen, wie z.B. klinisch pathologische Parameter, Deletionen und Amplifikationen, durchgeführt. Zur Untersuchung der Auswirkung von molekularen oder klinischen Parametern auf das Patientenüberleben wurden Kaplan-Meier-Kurven hergestellt und die mögliche Signifikanz von Verlaufsunterschieden mit einem Log-Rank-Test evaluiert.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung der klinischen Verlaufsdaten

Zur Klärung der Qualität der klinischen Verlaufsdaten wurden zunächst bereits etablierte Prognoseparameter mit den klinischen Verlaufsdaten in Bezug gesetzt. Diese Untersuchungen zeigen die hohe Qualität der Überlebensdaten. Der Nodalstatus (pN) war hochsignifikant mit dem Gesamtüberleben (Abbildung 8, $p < 0.0001$) und dem tumorspezifischen Überleben assoziiert (Abbildung 9, $p < 0.0001$). Auch der BRE Grad (G1-3) war hoch signifikant vergesellschaftet mit einem ungünstigen Gesamtüberleben (Abbildung 10, $p < 0.0001$) und einem tumorspezifischen Überleben (Abbildung 11, $p < 0.0001$). Für das Tumorstadium (pT) fand sich ebenfalls ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen einem fortgeschrittenem Stadium und einer ungünstigen Prognose. Dies galt für den Endpunkt Gesamtüberleben (Abbildung 12, $p < 0.0001$), wie auch für das tumorspezifische Überleben (Abbildung 13, $p < 0.0001$).

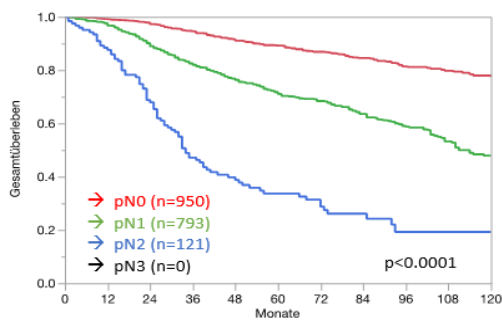


Abbildung 8: Gesamtüberleben und Nodalstatus (pN)

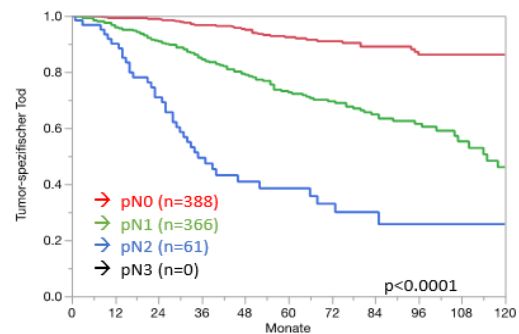


Abbildung 9: Tumorspezifisches Überleben und Nodalstatus (pN)

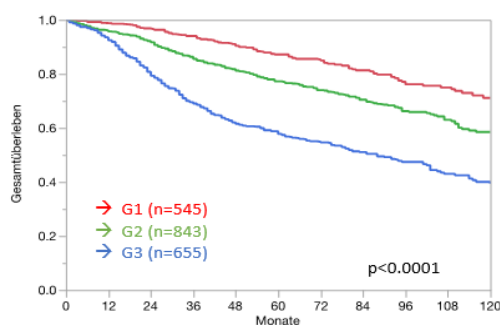


Abbildung 10: Gesamtüberleben und BRE Grad (G1-3)

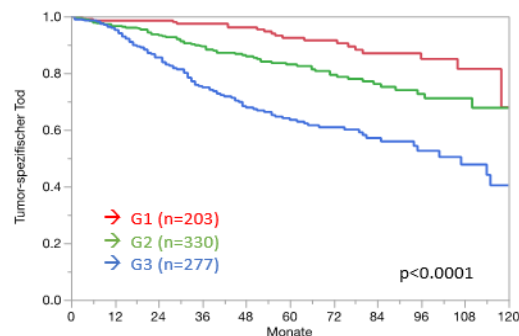


Abbildung 11: Tumorspezifisches Überleben und BRE Grad (G1-3)

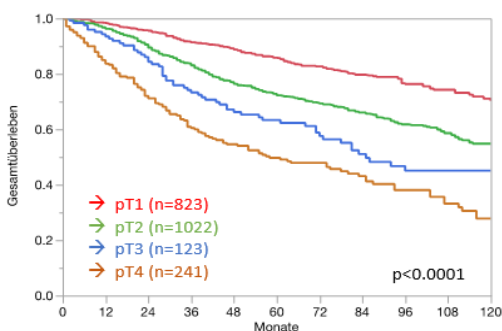


Abbildung 12: Gesamtüberleben und Tumorstadium (pT)

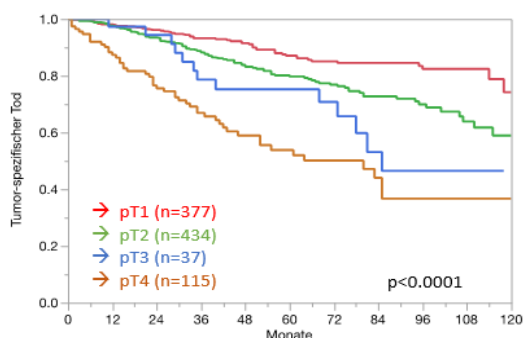


Abbildung 13: Tumorspezifisches Überleben und Tumorstadium (pT)

3.2. Technische Auswertbarkeit

Von 2.222 auf dem Array vorhandenen Tumorproben erwiesen sich 1.213 bezüglich dem Nachweis einer 16q22-Deletion als auswertbar. Bei 45,4% unserer 2.222 Proben konnte kein Deletionsstatus erhoben werden. Die Gründe für nicht auswertbare Gewebeproben waren das Fehlen eindeutiger Tumorzellen, eine ungenügende Hybridisierungsqualität oder aber das vollständige Fehlen von Gewebe an dem untersuchten Gewebespot.

3.3. FISH-Ergebnisse

Eine Deletion von 16q22 fand sich bei 179 (14,8 %) unserer 1.213 in der FISH auswertbaren Tumoren. Alle Deletionen waren heterozygot. Homozygote Deletionen waren in keinem der Präparate nachweisbar. Die Deletionshäufigkeit variierte geringgradig zwischen den histologischen Tumortypen (Tabelle 4). Dabei fällt insbesondere auf, dass lobuläre Karzinome mit 7,9% deletierten Fällen signifikant weniger häufig 16q22-Deletionen aufweisen als Tumoren vom Nicht-spezialen Typ (NST) (16%, $p=0.0206$). Auch bei Karzinomen mit duktalem, lobulärem und tubulärem Aspekt, waren 16q22-Deletionen selten nachweisbar, doch war dieser Unterschied im Vergleich zu NST-Tumoren aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant ($p=0.1852$).

Tabelle 4: 16q22-Deletion und verschiedene Tumortypen beim Mammakarzinom

Tumor Subtyp	Anzahl (n)	16q22 normal		16q22-Deletion		p-Wert (vs. NST)
		n	%	n	%	
Invasives Karzinom vom Nicht-spezialen Typ (NST)	911	765	83,97	146	16,03	
invasiv lobuläres Karzinom	101	93	92,08	8	7,92	0.0206
medulläres Karzinom	46	38	82,61	8	17,39	0.8077
kribriiformes Karzinom	28	24	85,71	4	14,29	0.8016
muzinöses Karzinom	24	20	83,33	4	16,67	0.9331
tubuläres Karzinom	13	11	84,62	2	15,38	0.9498
papilläres Karzinom	18	16	88,89	2	11,11	0.5548
apokrines Karzinom	8	7	87,5	1	12,5	0.7797
Karzinom mit duktalem, lobulärem und tubulärem Kennzeichen	27	25	92,59	2	7,41	0.1852
andere seltene Subtypen	15	15	100	0	0	0.0227

Die Beziehung von 16q22-Deletionen zum Tumorphänotyp ist für alle Tumore in Tabelle 5 zusammengefasst und für NST-Tumoren in Tabelle 6 separat dargestellt. Die Darstellung zeigt, dass keine relevanten Assoziationen zum histologischen Grad, dem pT- und dem pM-Stadium vorliegen. Es findet sich aber eine signifikante Beziehung zur Expression des Progesteronrezeptors ($p=0.0002$), allerdings nicht des Östrogenrezeptors ($p=0.1015$). Auch bei der Limitierung der Untersuchung auf das größte Subkollektiv von Tumoren (NST) zeigte sich ein ähnlicher Befund. Es ergab sich keinerlei Beziehung zwischen 16q22-Deletionen und den pathologischen Parametern. Es fand sich eine signifikant höhere 16q22-Deletionsrate in Östrogenrezeptor positiven Tumoren ($p=0.0479$) und vor allem in Progesteronrezeptor positiven Tumoren ($p=0.0003$).

Tabelle 5: 16q22-Deletion und Phänotyp beim Mammakarzinom

	Anzahl (n)	16q22 normal		16q22-Deletion		p-Wert
		n	%	n	%	
Alle Tumoren		1034	85,2	179	14,8	
BRE Grad						
1	201	166	82,6	35	17,4	0.4726
2	451	389	86,3	62	13,8	
3	461	390	84,6	71	15,4	
pT						
1	418	365	87,3	53	12,7	0.2131
2	563	476	84,6	87	15,5	
3	65	57	87,7	8	12,3	
4	137	110	80,3	27	19,7	
pN						
0	503	434	86,3	69	13,7	0.9231
+	437	378	86,5	59	13,5	
ER						
negativ	380	332	87,4	48	12,6	0.1015
positiv	788	660	83,8	128	16,2	
PR						
negativ	706	621	88,0	85	12,0	0.0002
positiv	414	330	79,7	84	20,3	

Tabelle 6: 16q22-Deletion und Phänotyp beim NST-Mammakarzinom

	Anzahl (n)	16q22 normal		16q22-Deletion		p-Wert
		n	%	n	%	
NST-Tumoren		765	84,0	146	16,0	
BRE Grad						
1	131	25	19,1	106	80,9	0.5043
2	331	49	14,8	282	85,2	
3	372	63	16,9	309	83,1	
pT						
1	315	42	13,3	273	86,7	0.168
2	423	70	16,6	353	83,5	
3	46	7	15,2	39	84,8	
4	111	25	22,5	86	77,5	
pN						
0	359	53	14,8	306	85,2	0.9318
+	344	50	14,5	294	85,5	
ER						
negativ	282	36	12,8	246	87,2	0.0479
positiv	596	107	18,0	489	82,1	
PR						
negativ	526	67	12,7	459	87,3	0.0003
positiv	319	71	22,3	248	77,7	

Die Untersuchung der prognostischen Relevanz der 16q22-Deletion ergab bei allen Tumoren eine Tendenz zu einer etwas günstigeren Prognose bei 16q22-deletierten Tumoren im Vergleich zu nicht deletierten Tumoren. Dies galt sowohl für das Gesamtüberleben (Abbildung 14) als auch für das tumorspezifische Überleben (Abbildung 15). Diese Ergebnisse erreichten aber keine statistische Signifikanz. Ein analoges Bild ergab sich bei separater Untersuchung der NST-Karzinome. Auch hier fand sich, sowohl bezüglich des Gesamtüberlebens (Abbildung 16) als auch des tumorspezifischen Überlebens (Abbildung 17), eine Tendenz zu günstigerer Prognose bei 16q22-deletierten Tumoren, aber diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

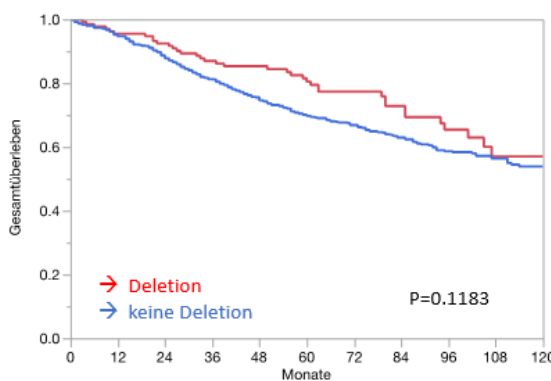


Abbildung 14: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (alle Tumoren)

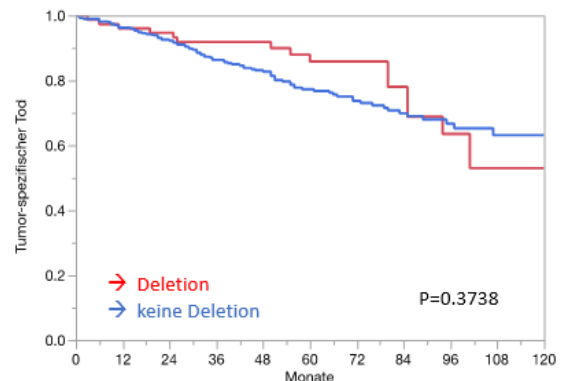


Abbildung 15: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (alle Tumoren)

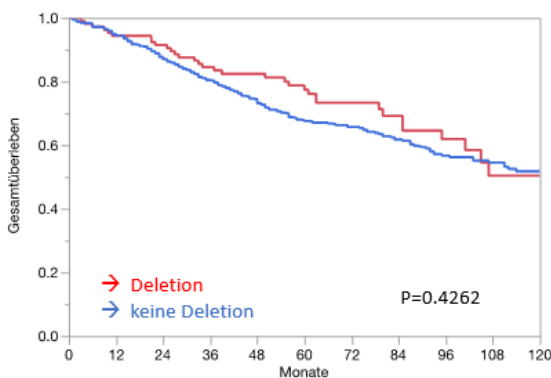


Abbildung 16: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (NST)

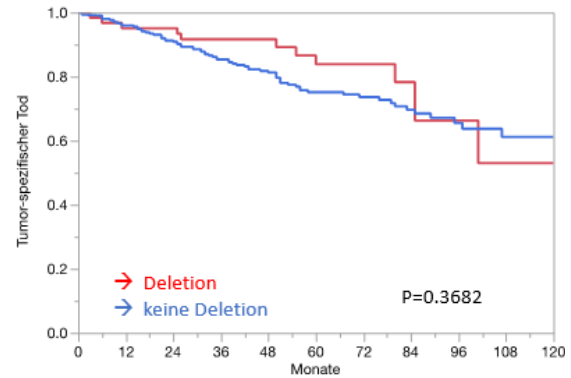


Abbildung 17: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (NST)

Die Untersuchung der nodalpositiven NST-Karzinome ergaben den gleichen Befund. Tendenziell verliefen die 16q22-deletierten Karzinome etwas besser, der Unterschied erreichte aber weder bezüglich Gesamtüberleben (Abb. 18) noch bezüglich des tumorspezifischen Überlebens statistische Signifikanz (Abbildung 19). Die separate Untersuchung der nodalnegativen NST-Karzinome ergab ebenfalls keinerlei signifikante Unterschiede, weder bezüglich Gesamtüberleben (Abbildung 20) noch bezüglich des tumorspezifischen Überlebens (Abbildung 21).

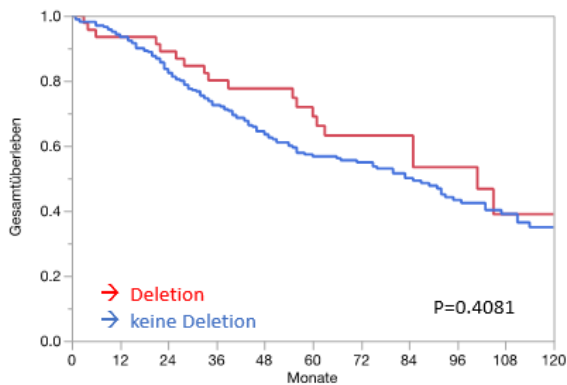


Abbildung 18. 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (nodalpositive NST-Tumoren)

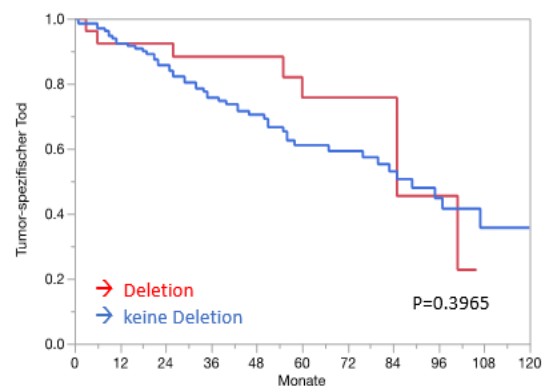


Abbildung 19. 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (nodalpositive NST-Tumoren)

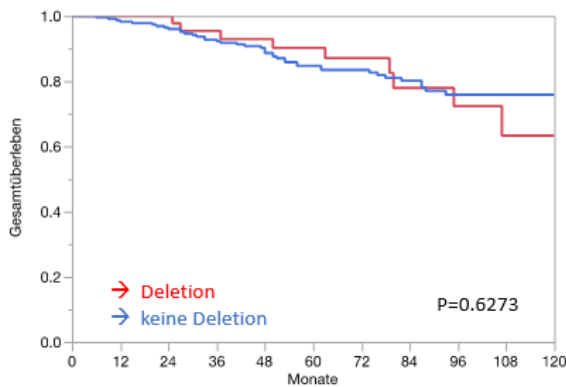


Abbildung 20. 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (nodalnegative NST-Tumoren)

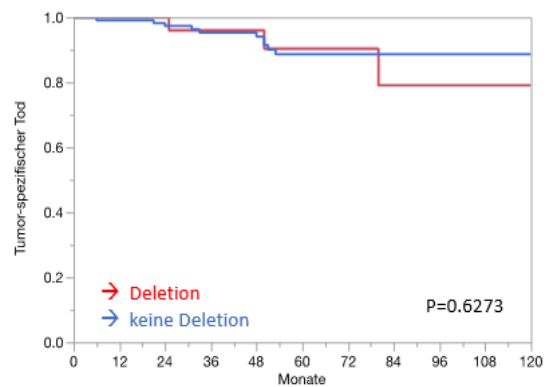


Abbildung 21. 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (nodalnegative NST-Tumoren)

3.4. 16q22-Deletionen und andere molekulare Parameter

Die Beziehung zwischen 16q22-Deletionen und anderen früher untersuchten Deletionen am gleichen Tumorkollektiv ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Darstellung zeigt, dass 16q22-Deletionen tendenziell mit den meisten anderen Deletionen assoziiert sind. Dieser Unterschied erreicht allerdings nur für die Deletionen von 8p21 ($p=0.0045$) und 13q14 ($p=0.0434$) statistische Signifikanz. Zuvor an dem Basler Tumorkollektiv untersuchte Genamplifikationen sind in Abbildung 23 dargestellt. Diese Darstellung zeigt, dass 16q22-Deletionen mit einem geringeren Risiko einer Cyclin-D1-(CCND1)-Amplifikation assoziiert sind, aber mit den anderen Amplifikationen keine statistischen Zusammenhänge aufweisen.

Die Beziehung zu früher untersuchten Proteinen, welche immunhistochemisch am gleichen TMA untersucht worden waren, zeigt für die Proteine p53, p16, Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase II (MTCO2), RNA-binding protein 3 (RBM3), LPCAT1, forkhead box P1 (FOXP1) und Her2/neu keine statistischen Zusammenhänge mit dem Vorliegen einer 16q22-Deletion (Abbildung 24).

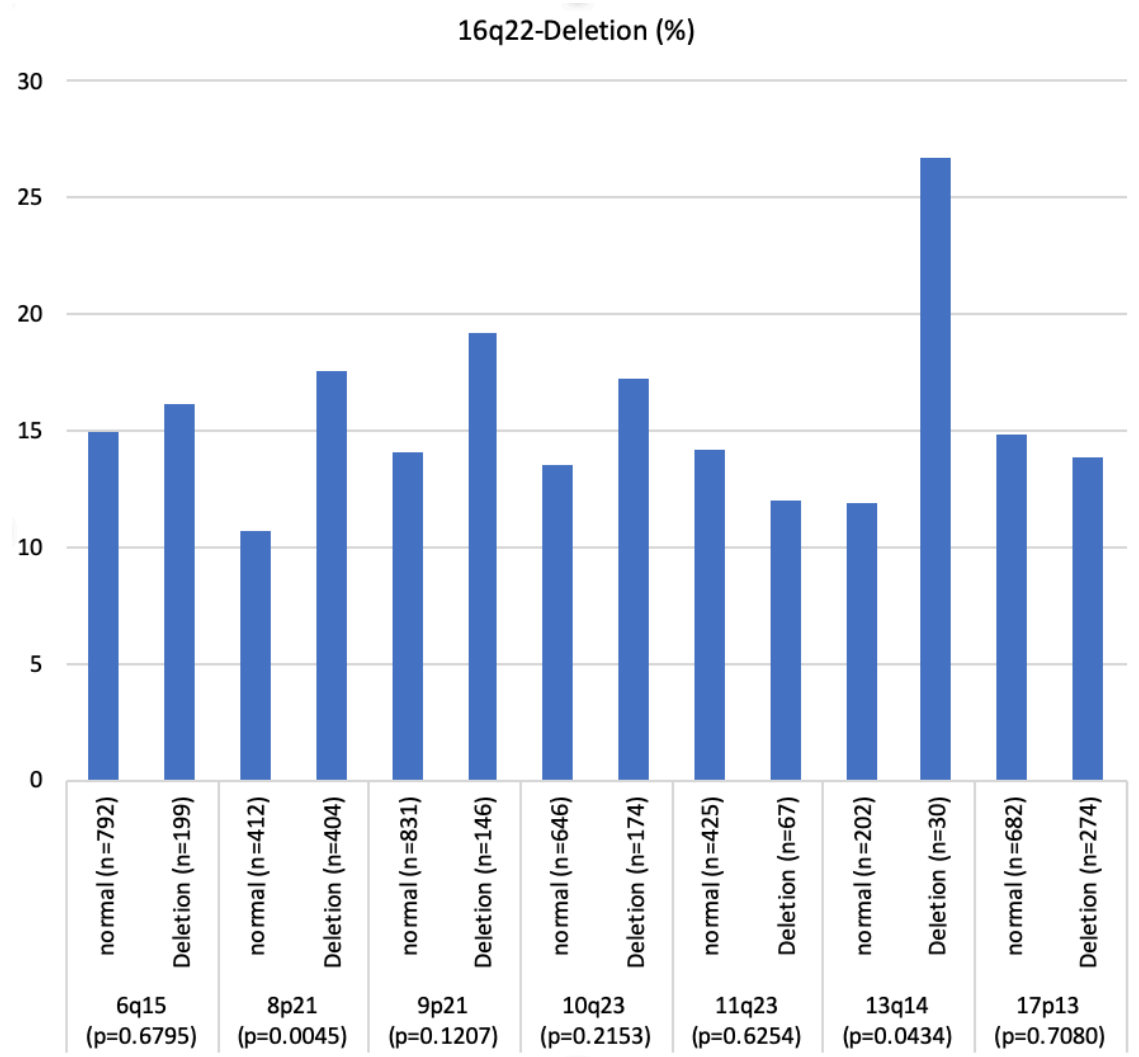


Abbildung 22: 16q22-Deletion vs. andere Deletionen

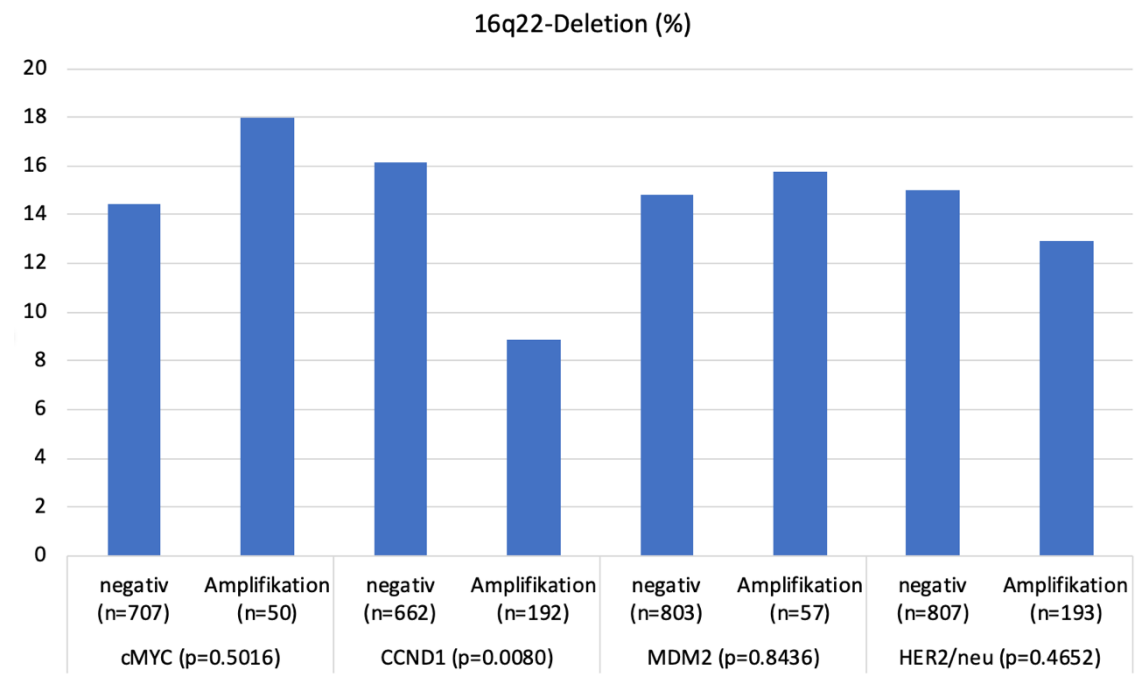


Abbildung 23: 16q22-Deletion vs. Amplifikationen

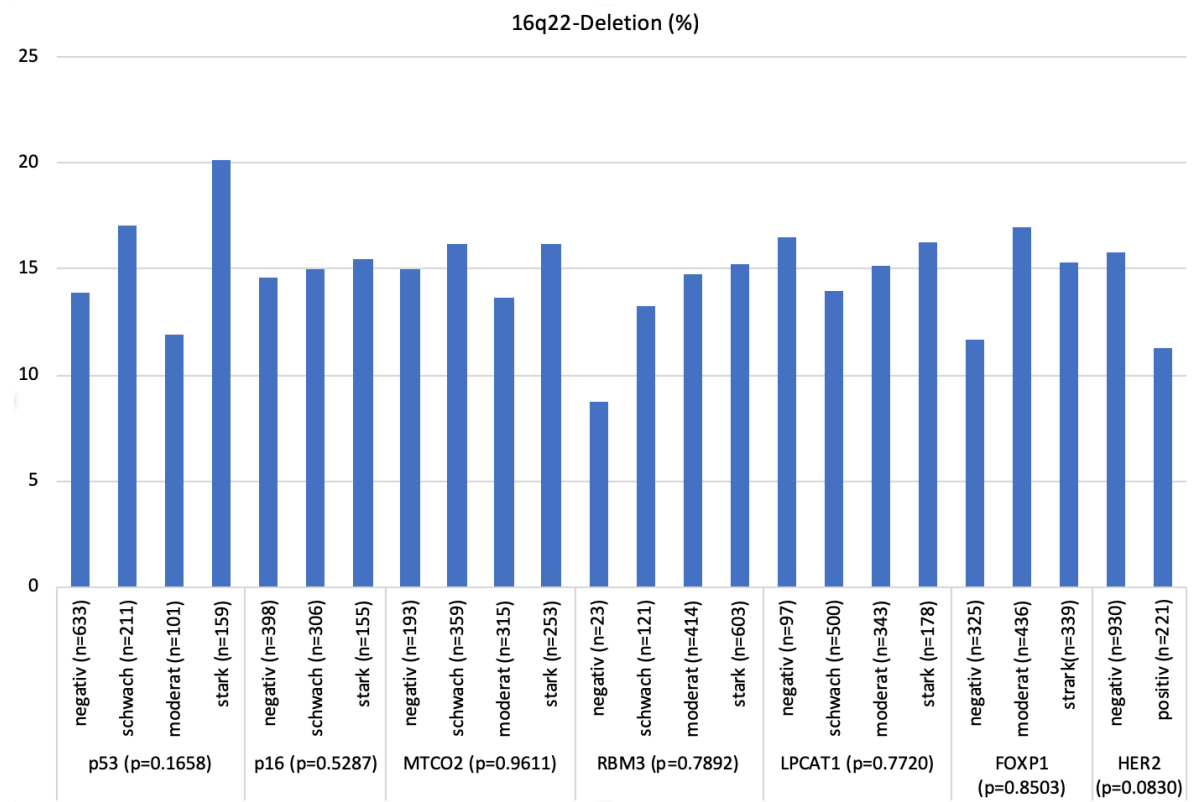


Abbildung 24: 16q22-Deletion und Expression relevanter Proteine

4. Diskussion

Mit insgesamt 1.766 erfolgreich untersuchten Mammakarzinome, davon 1.213 erfolgreich in der FISH-Analyse, ist die vorliegende Studie die größte jemals durchgeführte Studie zur Bedeutung der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom. Die umfangreiche Untersuchung wurde begünstigt durch die Tissue-Microarray-Methode, welche die Untersuchung großer Patientenkollektive wesentlich vereinfacht. Die Möglichkeit, 600 Tumoren auf einem einzigen Objektträger zu untersuchen, ist besonders dann vorteilhaft, wenn aufwendige Methoden wie eine Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung zur Anwendung kommen und wenn teure Reagenzien verwendet werden müssen. Nachdem der Tissue-Microarray bereits fertiggestellt vorlag, konnten die gesamten experimentellen Arbeiten zur Studie in 4 Tagen durchgeführt werden. Dass 1.213 von 2.222 auf dem Tissue-Microarray aufgebrachten Tumoren am Ende ein auswertbares FISH-Ergebnis zeigen, spricht für eine hohe Qualität der verwendeten Reagenzien und Protokolle. Der Erfolg einer FISH-Untersuchung hängt in hohem Ausmaß von der Qualität der Formalinfixation ab. Je länger das Gewebe in Formalin gelegen hatte, desto schwächer sind unter normalen Bedingungen die FISH-Signale (157).

Wenn das Gewebe nur kurzzeitig Formalin fixiert wurde oder beispielsweise vor der Formalinfixierung im Schnellschnitt tiefgefroren worden war, führt die normale FISH-Prozedur nicht selten zu einer „Überverdauung“ des Gewebes mit nicht oder schwierig auswertbaren FISH-Signalen. Aus den genannten Gründen müssen FISH-Untersuchungen in der diagnostischen Situation zu einem relevanten prozentualen Anteil unter Anpassung des Protokolls in Richtung geringere oder stringendere Vorbehandlung wiederholt werden (Prof. Dr. G. Sauter, persönliche Mitteilung). Um die wertvollen Tissue-Microarray-Blöcke nicht zu schnell aufzubrauchen, werden derartige Protokolloptimierungen bei Tissue-Microarray-Untersuchungen zu Forschungszwecken in der Regel nicht durchgeführt, sodass eine Auswertbarkeitsquote um die 79%, wie in unserer Studie für ein technisch sehr gutes Ergebnis spricht.

Der am häufigsten wahrgenommene „Nachteil“ der Tissue-Microarray-Methode ist die Limitierung des untersuchten Gewebes. Pro Karzinom werden nur jeweils ein 0,6 mm im Durchmesser messendes Gewebestück untersucht. Verschiedene Autoren haben vorgeschlagen, die Repräsentativität der Tissue-Microarray-Untersuchung durch Verwendung von Gewebeprobe mit größerem Durchmesser (1-2 mm) oder durch die Verwendung mehrerer Gewebesprots pro Tumor zu erhöhen (158-161). Diese Maßnahmen ergeben aber auch signifikante Nachteile. Eine Erhöhung des Durchmessers reduziert die Zahl, der auf einem Gewebestück aufnehmbaren Proben, von 600 auf 72. Dadurch schränkt es einen der größten Vorteile der Tissue-Microarray-Technik, nämlich die große Zahl der gleichzeitig untersuchten Proben, um einen Faktor größer 8 ein. Zudem ist es fragwürdig, ob heterogene Befunde in einem mehrere Zentimeter großen Tumor, sich in einem 2 mm großen Gewebestück besser identifizieren lassen, als in einem 0,6 mm großen Gewebestück. Die Verwendung von mehreren Proben pro Patient führt zu einer ungleichen Gewebemenge, die pro Patient zur Untersuchung gelangt. Werden beispielsweise 3 Gewebesprots pro Tumor in einen TMA gebracht, werden nicht bei jedem Patienten auch 3 Gewebesprots auswertbar sein, sodass bei einem solchen „3-Spot-pro-

Tumor-TMA“ pro Patient 1, 2 oder 3 Gewebeslots in die Auswertung eingehen können. Dabei ist bei Patienten mit mehr auswertbaren Spots die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses größer als bei Patienten mit nur einem auswertbaren Gewebeslot (162-164). Da aber nicht alle immunhistochemischen Färbungen auf einem Tissue-Microarray echte, spezifische Färbungen sind, steigt durch die Verwendung mehrerer Spots auch das Risiko einer unspezifischen, falschen Positivität. In der einzigen uns bekannten Studie, bei der am gleichen Mammakarzinom-Patientenkollektiv Prognosemarker sowohl am Tissue-Microarray als auch an Großschnitten untersucht worden waren, hatte sich für p53 eine Prognoserelevanz nur am Tissue-Microarray (bei 24% positiven Fällen), nicht aber am Großschnitt (bei 43% positiven Fällen) gefunden (162). Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil der am Großschnitt erzielten positiven Ergebnisse eine unspezifische Färbung darstellte.

Die in dieser Studie gefundene Häufigkeit von 16q22-Deletionen lag bei allen Tumoren bei 14,8% und für die größte Gruppe (NST-Tumore) bei 16%. Diese Zahl war etwas geringer als die in der Datenbank des „The Cancer Genom Atlas (TCGA)“, in welcher an mehr als 1000 Mammakarzinomen eine Häufigkeit der 16q22-Deletion von 21,4% beschrieben wurde. Noch größere Häufigkeiten der 16q22-Deletion fanden sich in mehreren Studien, welche Loss of Heterozygosity (LOH)-Analysen durchführten. Sämtliche frühere Studien zu 16q-LOH beim Mammakarzinom sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Untersuchungen betreffen 10-712 Fälle und beschreiben Deletionshäufigkeiten von 24-71%. Aus methodischen Gründen ist davon auszugehen, dass in LOH-Studien beschriebene Häufigkeitswerte nicht der Realität entsprechen. Die LOH-Analyse basiert auf der Messung von Unterschieden in der Prävalenz von maternalen und paternalen Allelen in Tumorzellen, wobei Allel-Inbalancen nicht nur durch eine Deletion eines Alleles, sondern auch durch einen Zugewinn eines Alleles z.B. im Rahmen einer Trisomie oder einer Genamplifikation bedingt sein können (165). Die FISH-Untersuchung repräsentiert den Goldstandard für die Untersuchung von numerischen Genomaberrationen an Gewebeschnitten (155, 166, 167). Dabei wird eine Einzelzellanalyse durchgeführt, wobei für jede einzelne Tumorzelle die Zahl der Chromosomen (Zentromere) und der analysierten Gene vergleichend betrachtet werden können. Ein wesentlicher Vorteil der FISH-Technik liegt darin, dass die Daten nicht durch eine mögliche Beimengung nicht-neoplastischer Zellen kompromittiert werden können, da die nicht neoplastischen Zellen als solche erkannt und von der Untersuchung ausgeschlossen werden können (156, 168, 169).

Tabelle 7: LOH-Analysen von 16q-Deletion beim Mammakarzinom

Studie	Jahr	Fälle (n)	16q-Deletion (%)	Lit.
Cleton-Jansen et al.	2001	712	52	(146)
Cleton-Jansen et al.	2004	104	24	(147)
Hansen et al.	1998	199	61	(141)
Skirnisdottir et al.	1995	150	58	(170)
Berx et al.	1995	49	63	(171)
Lindblom et al.	1993	82	28	(172)
Dorion-Bonnet et al.	1995	46	41	(173)
Cleton-Jansen et al.	1994	79	63	(174)
Tsuda et al.	1994	78	49	(175)
Caligo et al.	1998	36	44	(176)
Driouch et al.	1997	77	60-65	(177)
Takita et al.	1992	312	55	(178)
Sato et al.	1991	219	51	(149)
Larsson et al.	1990	52	39	(179)
Tsuda et al.	1996	37	43-71	(148)
Tsuda et al.	1995	60	54	(180)
Deng et al.	1994	59	48	(181)
Sato et al.	1990	79	45	(182)
Chalmers et al.	2001	10	60	(183)

Der bedeutendste statistische Befund unserer Untersuchung ist ein deutlicher Häufigkeitsunterschied der 16q22-Deletion zwischen NST-Karzinomen und lobulären Karzinomen (16% vs. 7,9%, $p=0.0206$). Diese Befunduntersuchung passt zu den bekannten erheblichen biologischen Unterschieden zwischen lobulären und NST-Karzinomen. Viele molekulare Parameter unterscheiden sich substantiell zwischen NST- und lobulären Karzinomen. So kommen beispielsweise Genamplifikationen und insbesondere die therapeutisch relevante HER2/neu-Amplifikation bei lobulären Karzinomen nur selten vor (184). Deutliche Unterschiede zwischen lobulären und NST-Karzinomen wurden beispielsweise auch für die CDH1-Mutation gefunden, wobei diese Mutation in mehreren Studien beim NST-Karzinom in 2-6% der Fälle und beim lobulären Karzinom in 50-70% der Fälle gefunden wurde (185-189).

Eine klinische Bedeutung ließ sich für die 16q22-Deletion in unserem Patientenkollektiv nicht nachweisen. Die 16q22-Deletion war weder mit dem BRE-Grad noch mit dem pN- oder pT-Status oder der Patientenprognose assoziiert. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den meisten anderen Studien, welche die Prognoserelevanz der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom untersucht haben. Sämtliche Studien, welche die Beziehung von 16q-Deletionen und der Prognose beim Mammakarzinom untersucht haben, sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Studie zu 16q-Deletion und Patientenprognose beim Mammakarzinom

Erstautor	Jahr	n	Methode	% 16q Deletion	Assoziation (Ass.) Phänotyp ja/nein	Ass. pN ja/nein	negativ Ass. pM ja/nein	Ass. BRE Grad ja/nein	Ass. gute Prognose	Lit.
Tsuda et al.	1997	26	FISH	92 %	intrazytisch papillär untersucht	nein	/	ja Grad I	/	(153)
Hansen et al.	1998	199	LOH	16q23.2-24.2: 61%	nein	nein	ja (p=0.0005)	nein	p=0.002	(141)
Skirmisdottir et al.	1995	150	LOH	Allelic imbalance 16q22: 58%	ja PR positiv (p=0.028)	nein	nein	nein	p=0.6198	(170)
Nordgard et al.	2008	112	SNP-CGH	38 %	ja Luminal A (p=0.001)	/	/	/	p=0.007	(142)
Roylance et al.	2006	106	a-CGH	16q: 44%, any loss: 16q 82%	nein	nein	nein	ja G1 häufiger p=0.006	p=0.02	(143)
Lindblom et al.	1993	82	LOH	28 %	nein	nein	nein	nein	p<0.0003 [1]	(172)
Seute et al.	2001	44	CGH	16q23.2-24.2: 20 %	/	/	/	/	p=0.020	(116)
Hislop et al.	2002	40	CGH	20 %	/	/	/	/	p=0.002	(144)
Lida et al.	1997	210	LOH	67 %	nein	nein	nein	nein	/	(190)
Zudaire et al.	2002	70	CGH	21 %	ja ER pos (p<0.001)	ja neg LK (p=0.025)	/	nein	ja	(145)
Cleton-Jansen et al.	2001	712	LOH	16q: 52% 16q22: 8%	Ja ER pos (p=0.04)	/	/	nein	/	(146)
Wang et al.	2004	89	SNP-CGH	16q23-24: 57%	Ja Luminal A (p=0.001)	/	/	/	/	(191)
Farabegoli et al.	2004	46	CGH	16q12-pter 59%	Ja ER/PR pos p=0.02	nein	/	nein	p=0.916	(192)
Natrajan et al.	2009	93	CGH	16qter: 37%	Ja negativ Ass. basal-like, Her2/neu, Luminal p=0.0271	/	/	/	/	(193)

Prognostischer Wert bezüglich Disease-free survival = Relapse-free survival von Mammakarzinomen mit 16q-Deletion [1] = einziger p-Wert für negatives outcome, wobei sich dieses Kollektiv aus familiärem Brustkrebs zusammen stellt

Obwohl die meisten Studien wesentlich kleinere Patientenzahlen untersuchten als die hier präsentierte Studie, konnte in einigen früheren Studien eine Assoziation von 16q22-Deletion und einer günstigeren Prognose gefunden werden.

Der fehlende Nachweis einer prognostischen Bedeutung der 16q22-Deletion ist insgesamt unerwartet, da die meisten chromosomalen Deletionen, welche an ausreichend großen Patientenkollektiven untersucht wurden, sich auch als prognostisch relevant erwiesen haben. Dies gilt beispielsweise für Deletionen von 3p13, 5q21, 6q, 8p, 10q23, 12p, 13q, 16q23, 18q beim Prostatakarzinom (100-110, 194) oder Deletionen von 8p, 9p und 10q beim Mammakarzinom (84, 85, 120). Alle die genannten Prostata- und Mammakarzinom-Studien wurden am Institut der Pathologie am UKE, unter Verwendung identischer Protokolle und Auswertungskriterien, durchgeführt. Die fehlende Prognoserelevanz der 16q-Deletion beim Mammakarzinom ist auch angesichts der Häufigkeit dieser Deletion von Interesse. Tabelle 9 zeigt eine Darstellung der Häufigkeiten von Deletionen im TCGA-Mammakarzinom-Kollektiv, in welchem die 16q22-Deletion als dritthäufigste Deletion rangiert. Bei der 16q-Deletion handelt es sich damit um eine besonders häufige und gleichzeitig biologisch/klinisch besonders wenig relevante Deletion. Welche Gene durch eine 16q22-Deletion inaktiviert, beziehungsweise kompromittiert werden, ist nicht ganz klar. Tabelle 10 zeigt eine Liste der häufigsten mutierten 16q-Gene beim Mammakarzinom, welche auf einem kombinierten International Cancer Genom Consortium/The Cancer Genom Atlas (ICGC/TCGA) Datensatz von 2.509 Fällen basiert. Das am häufigsten mutierte Gen ist das epitheliale Cadherin-1 (E-Cadherin, CDH1). Eine Funktionsstörung von E-Cadherin ist ein diagnostisches Kriterium für das Vorliegen eines lobulären Mammakarzinoms und schließt ein NST-Karzinom weitgehend aus (195-197). Da 16q22-Deletionen allerdings bei NST-Karzinomen deutlich häufiger sind als bei lobulären Karzinomen, ist es so unwahrscheinlich, dass CDH1 ein Hauptziel der 16q22-Deletion ist. Auch die anderen Gene wie Core Binding Factor Beta (CBF β), SET Domain Containing 1A (SETD1A), FA Complementation Group A (FANCA), CCCTC-binding Factor (CTCF) und SIAH E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (SIAH1) sind zu selten mutiert, um im Fall von 16q22-Deletionen eine biallelische Inaktivierung erwarten zu lassen. Zudem liegen SETD1A und SIAH1 sowie auch FANCA deutlich von dem in dieser Studie untersuchten 16q22-Locus entfernt (198-200). Insgesamt ist die 16q-Deletion meist sehr groß und betrifft nicht selten den ganzen Arm. Eine zusammenfassende Darstellung des Ausmaßes von 16q-Deletionen beim Mammakarzinom ist in Abbildung 25 dargestellt. Am ehesten ist davon auszugehen, dass zumindest die allermeisten 16q22-Deletionen mehrere krebsrelevante Gene beinhalten. Es erscheint wahrscheinlich, dass die gleichzeitig reduzierte Expression von mehreren möglicherweise miteinander interagierenden Genen im Falle von großen Deletionen eine krebsbegünstigende Wirkung ausüben (201, 202). Dies auch als Haploinsuffizienz bezeichnete Prinzip hat in den letzten Jahren das Knudson'sche Konzept abgelöst, welches besagt, dass Deletionen nur in Kombination mit der gleichzeitigen Inaktivierung des zweiten Alleles (beispielsweise durch eine Mutation) einen krebsfördernden Effekt ausüben (*Two-Hit-Hypothesis*) (103, 202-205). Dass 16q-Deletionen meist sehr groß sind, wurde in vielen früheren Publikationen erkannt. In Abbildung 26 sind Schemata aus 9 verschiedenen Publikationen reproduziert, welche das Ausmaß der 16q-Deletionen mittels Comparative Genomic Hybridisation untersucht hatten (145, 192, 206-212).

Tabelle 9: Häufigkeit der Deletionen im TCGA-Mammakarzinom-Kollektiv

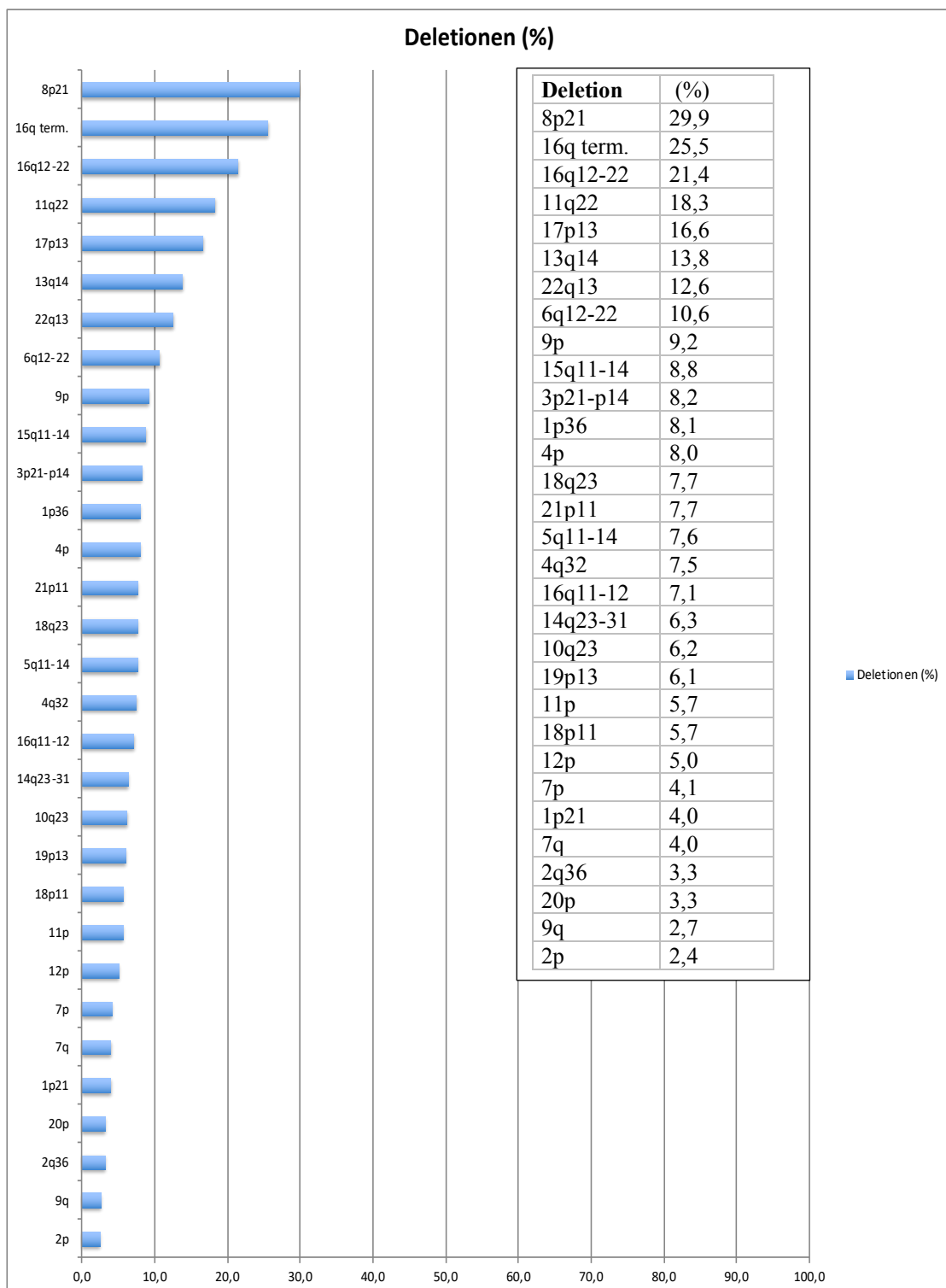


Tabelle 10: Am häufigsten mutierte Gene auf Chromosom 16q

Gene	Mutiert (n)	Frequenz	Is Cancer Gene (Source:OncoKB)	Cytoband
CDH1	236	9.4%	Yes	16q22.1
CBFB	109	4.3%	Yes	16q22.1
SETD1A	69	2.8%	Yes	16p11.2
FANCA	60	2.4%	Yes	16q24.3
CTCF	54	2.2%	Yes	16q21-22.3
SIAH1	1	<0.1%	No	16q12.1

Daten aus dem (ICGC/TCGA) Metabric Dataset, n=2,509

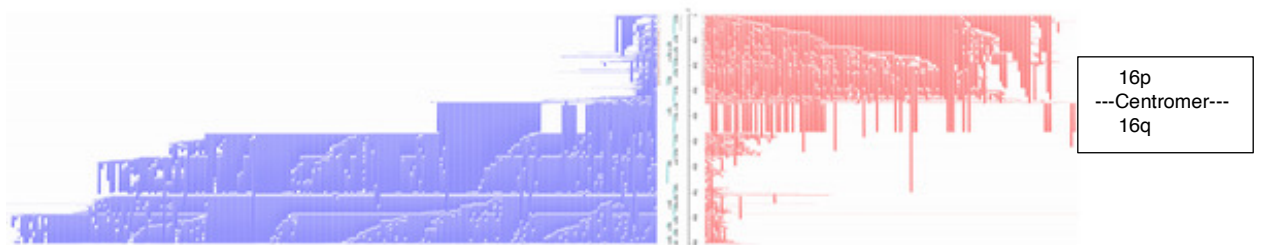


Abbildung 25: Deletion und Amplifikation des Chromosoms 16 (ICGC/TCGA Dataset)

Daten aus dem (ICGC/TCGA) Metabric-Dataset.

Blau = Deletion, Rot = Amplifikation.

Der obere Abschnitt stellt den kleinen Arm (16p) von Chromosom 16 dar, der untere Abschnitt den großen Arm (16q). Dies zeigt deutlich eine Mehrheit von Amplifikationen bei 16p und das Ausmaß von Deletionen bei 16q.

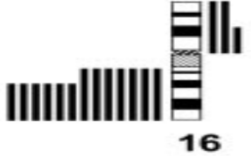
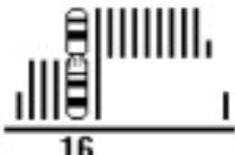
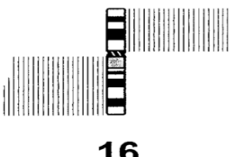
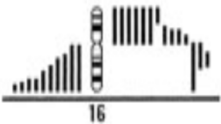

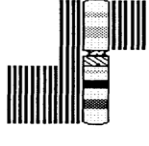
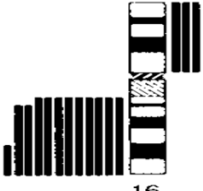


Lit.	Abbildungen
(206)	
(207)	
(208)	
(209)	
(210)	
(145)	
(211)	
(212)	
(192)	

Abbildung 26: Daten zu 16q-Deletionen aus Studien mittels Comparative Genomic Hybridisation (CGH)

Die vertikalen Balken links des Chromosoms zeigen Regionen chromosomaler Deletion. Die vertikalen Balken rechts des Chromosoms zeigen Regionen chromosomaler Amplifikation. Jeder dieser Balken illustriert einen Tumor und dessen betroffene Region auf einem Chromosom.

Eine der wesentlichen Stärken der Tissue-Microarray-Methode liegt in der relativen Einfachheit, große Tumorkollektive auf einen molekularen Parameter zu untersuchen, so dass nach Durchführung zahlreicher Studien schnell ein Patientenkollektiv mit einem großen Satz von molekularen Daten entstehen kann. Frühere Untersuchungen an dem Basler-Mammakarzinom-Tissue-Microarray hatten bereits genomische Amplifikationen und Deletionen, aber auch die Expression relevanter Proteine evaluiert.

Sämtliche früher an diesem Tissue-Microarray untersuchten Parameter, wie die 8q21-Amplifikation (213), Amplified In Breast 1 (AIB1, NCoA3)-Amplifikation (214), die Amplifikation von CCND1, ERBB2/Her2, MYC wie auch die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptor (164, 215, 216), MDM2-Amplifikation (217), Estrogenrezeptor alpha (ESR1)-Amplifikation (218), PTEN-Deletion (84), 8p-Deletion (85), Reelin-Protein (219), Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-Protein (220), LPCAT1-Protein (83), Branched-Chain Amino Acid Transaminase 1 (BCAT1)-Protein (221), VEGFR-Protein (82), Class III β -tubulin (TUBB3)-Protein (222), Bladder Cancer-Associated Protein (BLCAP)-Protein (223), C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) -Rezeptorprotein (224) hatte eine signifikante Assoziation mit der Prognose ergeben.

Dies macht deutlich, dass dieser Mammakarzinom-Tissue-Microarray geeignet ist, um molekulare Prognosemarker zu identifizieren und zeigt auch die Ausnahmestellung der 16q-Deletion als eine häufige, aber klinisch nicht relevante molekulare Veränderung.

Da die biologische Funktion der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom nicht komplett verstanden ist, sollte der Vergleich mit besser verstandenen molekularen Veränderungen einen möglichen funktionellen Zusammenhang aufzeigen. Leider zeigte die 16q22-Deletion aber keine besonders engen Zusammenhänge mit einer oder mehreren der früher untersuchten molekularen Faktoren. Auffälligster Befund war eine Tendenz zu mehr Deletionen anderer Loci in Tumoren mit 16q22-Deletionen. Dies dürfte dadurch zu erklären sein, dass Deletionen gehäuft in Tumoren entstehen, welche einen Defekt in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen aufweisen. Derartige Defekte führen dann zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Deletionen aller Art und dementsprechend auch zu signifikanten Assoziationen zwischen verschiedenen Deletionen (225, 226). Die größte statistische Signifikanz fand sich für den Zusammenhang zwischen der 16q22-Deletion und der Expression von Progesteronrezeptor. Andere Untersucher hatten einen derartigen Zusammenhang ebenfalls gefunden (170). Eine mechanistische Ursache für diesen Zusammenhang ist in der Literatur nicht bekannt. Allerdings passt eine mögliche Interaktion mit Mechanismen, welche die Progesteronrezeptorexpression steuern, zu einer Sonderrolle der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom. Die meisten Studien, welche 16q22-Deletion beim Mammakarzinom untersucht hatten, hatten eine günstige Prognose von 16q22-deletierten Tumoren gezeigt. Bei anderen Tumorarten sind 16q-Deletion in der Regel mit ungünstiger Prognose assoziiert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Negative prognostische Assoziation von 16q-Deletion bei Karzinomen außerhalb der Brust

Erstautor	Jahr	Tumor	n	16q Del %	Ass. pT ja/nein	Ass. Grading ja/nein	Ass. pN ja/nein	p-Wert bei schlechter Prognose	Lit.
Kluth et al.	2017	Prostata	7894	28	ja (p<0.0001)	ja (p<0.0001)	ja (p<0.0001)	p<0.0001 [1]	(103)
Kluth et al.	2015	Prostata	7482	21	ja (p<0.0001)	ja (p<0.001)	ja (p<0.0001)	p<0.0001 [1]	(108)
Elo et al.	1999	Prostata	44	50	/	ja (p<0.05)	/	p=0.072 [3]	(227)
Nishida et al.	2002	HCC	49	33	/	/	/	p<0.001 [2]	(131)
Kihana et al.	1996	Endometrium	58	40	nein	ja (p=0.038)	nein	p=0.0003 [3]	(132)
Partheen et al.	2004	Ovarialkrebs	98	24	/	ja (p<0.05)	/	p<0.05 [3]	(133)
Rogers et al.	2017	AML	52	35	/	/	/	p=0.0002 [3]	(134)
Jenner et al.	2007	Multiples Myelom	861	14-18	/	/	/	p=0.025 [3]	(135)
Walker et al.	2010	Multiples Myelom	372	35	/	/	/	Nicht signifikant [3]	(228)
Messahel et al.	2009	Wilmstumor	426	15	nein (p=0.62)	/	/	p=0.001 [1] p=0.02 [3]	(136)
Grundy et al.	1994	Wilmstumor	232	17	/	/	/	p=0.01 [1] p<0.0001 [3]	(137)
Spreafico et al.	2013	Wilmstumor	125	12	/	/	/	p=0.94 [1]	(229)
Skotnicka-Klonowicz et al.	2000	Wilmstumor	66	21	ja (p<0.05)	nein (p>0.05)	/	p<0.05 [3] p=0.0024 [4]	(138)
Jiang et al.	1998	Nierenkarzinom	615	32	/	/	/	p=0.1 [3]	(230)
Coco et al.	2011	Medulloblastom	86	16	/	/	/	p=0.58 [1] p<0.05 [3]	(139)
Ozaki et al.	2001	Ewing Sarkom	62	21	/	/	/	p<0.001 [3]	(140)
<i>Negativ prognostischer Wert bezüglich 16q-Deletion. Sortiert nach Krebsart.</i>									
Hepatocelluläres Carcinom (HCC), akute myeloische Leukämie (AML), [1] relapse-free survival = disease-free survival; [2] metastasis-free survival; [3] overall survival; [4] frequency-of-death									

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Untersuchung, dass die 16q22-Deletion beim Mammakarzinom häufig vorkommt, aber keine klinisch relevante prognostische Bedeutung aufweist. Die vergleichende Untersuchung von 16q22-Deletionen mit insgesamt 22 klinischen und molekularen Parametern (histologisches Grading, pT-Kategorie, pN-Kategorie, Her2/neu (IHC und FISH), Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, proliferativer Index/Ki67, p53 (IHC), p16, CCND1, MDM2, c-myc, MTC02, RBM3, LPCAT1, FOXP1, 6q15, 8p21, 9p21, 10q23, 17p13, 13q14) ergab als herausragenden Befund eine enge Assoziation mit der Expression von Progesteronrezeptor und einem verminderten Auftreten einer Cyclin-D1-Amplifikation. Eine funktionelle Erklärung hierfür ist nicht bekannt. Der Befund passt aber zur Sonderrolle der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom, wo diese Deletion tendenziell mit günstiger Prognose assoziiert ist, bei den meisten anderen Tumoren aber mit einer schlechten Prognose und einer raschen Tumorprogression.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor bei Frauen. Die Therapie besteht üblicherweise aus einer operativen Entfernung des Tumors mit anschließender Bestrahlung und je nach Risikosituation einer darauffolgenden adjuvanten Chemotherapie. Um die Indikation zur Chemotherapie zuverlässiger stellen zu können, besteht ein Bedürfnis nach neuen, besseren Prognosemarkern.

Die 16q22-Deletion gehört zu den häufigsten Deletionen beim Mammakarzinom. Zur Klärung der prognostischen Bedeutung der 16q22-Deletion wurde ein Tissue-Microarray bestehend aus 2.222 Mammakarzinomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Sonden für 16q22 (in Rot) und Centromer 16 (in Grün) untersucht. Von 1.766 untersuchten Gewebeproben waren 1.213 (68,7%) in der FISH auswertbar. Eine heterozygote Deletion von 16q22 fand sich in 14,8 Prozent der 1.213 auswertbaren Tumoren. Homozygote Deletionen wurde nicht beobachtet. Die 16q22-Deletion war signifikant häufiger in Karzinomen vom nicht-spezialen Typ (NST) (16%) als in lobulären Karzinomen (7,9%) ($p=0.0206$). 16q22-Deletionen waren weder im Gesamtkollektiv aller Tumoren noch in den NST-Tumoren mit der pT-Kategorie, dem Nodalstatus oder dem BRE-Grad assoziiert.

16q22-Deletionen zeigten sowohl in allen Tumoren als auch der Untergruppe der NST-Tumoren eine Tendenz zu günstigerer Prognose, doch erreichte dieser Befund weder bei der Verwendung des Endpunktes Gesamtüberleben ($p=0.1183$) noch beim Endpunkt tumorspezifisches Überleben ($p=0.3738$) statistische Signifikanz. Der Vergleich von 16q22-Deletion mit den molekularen Parametern p53, p16, MTCO2, RBM3, LPCAT1, FOXP1, Deletionen von 6q15, 9p21, 10q23, 11q23, 17p13 und Amplifikationen von cMYC, MDM2, Her2/neu, ergab im Gesamtkollektiv aller Tumoren einen signifikanten Zusammenhang von 16q22-Deletionen mit einer vermehrten Expression vom Progesteronrezeptor ($p=0.0002$), Deletionen von 8p21 ($p=0.0045$), Deletionen von 13q14 ($p=0.0434$) und verminderte Amplifikation von Cyclin D1 (CCND1) ($p=0.008$). Die positive Beziehung zum Progesteronrezeptor und das geringere Risiko einer Cyclin-D1-Amplifikation, welche mit einem erhöhtem Rezidivrisiko und einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert ist (231), passt zu der bekannten Sonderrolle der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom, wodurch diese Deletion im Gegensatz zu anderen Tumoren nicht mit einer ungünstigen Prognose, sondern vielleicht sogar mit einer eher günstigen Prognose assoziiert ist. Das Fehlen einer statistisch signifikanten Prognoserelevanz der 16q22-Deletion spricht aber gegen eine klinische Nutzbarkeit der Analyse der 16q22-Deletion beim Mammakarzinom.

6. Abstract

Breast cancer is the most common cancer in woman. Therapy includes surgical removal of the cancer followed by adjuvant therapy. Nowadays, the increasing use of individual therapy demands the accurate prediction of recurrence risk. 16q deletion is the third most common deletion in breast cancer. As previously presented in other malignancies like prostate or kidney cancer, 16q deletion appears to have a predictive function.

To clarify its importance as a prognostic marker for breast cancer patients, a tissue microarray (TMA) with 2.222 breast cancers was analyzed by fluorescence in-situ hybridization (FISH). 16q22 heterozygous deletions was found in 14,8% of 1.213 analyzable breast cancers. There were no homocygous deletions. 16q22 deletion was seen more often in breast cancers of no special type (NST) (16%) than in lobular breast cancers (7,9%) ($p=0.0206$). No significant association was observed between 16q22 deletion and histological subtypes, nodal status, tumor stage and BRE grade. A tendency towards a good prognosis was found in 16q22-deleted cancers but showed no statistical significance in overall survival ($p=0.1183$) and tumorspecific survival ($p=0.3738$).

A comparison between 16q22 deletion and other molecular parameters like p53, p16, MTCO2, RBM3, LPCAT1, FOXP1, deletions of 6q15, 9p21, 10q23, 11q23, 17p13 and amplifications of cMYC, MDM2, Her2/neu showed a significant association of 16q22 deletion with a higher expression of progesteron receptor ($p=0.0002$), lower risk of Cyclin D1/CCND1 amplification ($p=0.008$), deletion of 8p21 ($p=0.0045$) and deletion of 13q14 ($p=0.0434$).

Positive association with expression of progesterone receptor and reduced amplification of Cyclin D1 might be linked to better prognosis of breast cancer patients with 16q22 deletion. This emphasizes a special role of 16q22 deletion in breast cancer. Our study shows tendencies towards 16q22 deletion being a positive prognostic marker. Nevertheless, 16q22 deletion cannot be used as a reliable independent prognostic marker as it failed to show a significant association with survival.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1: Prognoserelevanz von Deletionen beim Mammakarzinom
 - Tabelle 2: Patientenkollektiv des verwendeten Tissue-Microarrays (TMA)
 - Tabelle 3: Ausschnitt eines anonymisierten TMA-Datenfiles
 - Tabelle 4: 16q22-Deletion und verschiedene Tumortypen beim Mammakarzinom
 - Tabelle 5: 16q22-Deletion und Phänotyp beim Mammakarzinom
 - Tabelle 6: 16q22-Deletion und Phänotyp beim NST-Mammakarzinom
 - Tabelle 7: LOH-Analysen von 16q-Deletion beim Mammakarzinom
 - Tabelle 8: Studie zu 16q-Deletion und Patientenprognose beim Mammakarzinom
 - Tabelle 9: Häufigkeit der Deletionen im TCGA-Mammakarzinom-Kollektiv
 - Tabelle 10: Am häufigsten mutierte Gene auf Chromosom 16q
 - Tabelle 11: Negative prognostische Assoziation von 16q-Deletion bei Karzinomen außerhalb der Brust
-
- Abbildung 1: Überleben beim Mammakarzinom und Lymphknotenstatus (pN)
 - Abbildung 2: TMA – Aufbau (UKE)
 - Abbildung 3: Das Patientenkollektiv bestehend aus 6 TMA-Blöcken
 - Abbildung 4: Übersichtsaufnahme eines HE Schnittes von Array-Block A
 - Abbildung 5: Detailaufnahme von 4 Mammakarzinomen bei stärkerer Vergrößerung
 - Abbildung 6: FISH-Tumorpräparat mit 16q22-Deletion
 - Abbildung 7: FISH-Tumorpräparat ohne 16q22-Deletion
 - Abbildung 8: Gesamtüberleben und Nodalstatus (pN)
 - Abbildung 9: Tumorspezifisches Überleben und Nodalstatus (pN)
 - Abbildung 10: Gesamtüberleben und BRE Grad (G1-3)
 - Abbildung 11: Tumorspezifisches Überleben und BRE Grad (G1-G3)
 - Abbildung 12: Gesamtüberleben und Tumorstadium (pT)
 - Abbildung 13: Tumorspezifisches Überleben und Tumorstadium (pT)
 - Abbildung 14: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (alle Tumoren)
 - Abbildung 15: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (alle Tumoren)
 - Abbildung 16: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (NST)
 - Abbildung 17: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (NST)
 - Abbildung 18: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (nodalpositive NST-Tumoren)
 - Abbildung 19: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (nodalpositive NST-Tumoren)
 - Abbildung 20: 16q22-Deletion und Gesamtüberleben (nodalnegative NST-Tumoren)
 - Abbildung 21: 16q22-Deletion und tumorspezifisches Überleben (nodalnegative NST-Tumoren)
 - Abbildung 22: 16q22-Deletion vs. andere Deletionen
 - Abbildung 23: 16q22-Deletion vs. Amplifikationen
 - Abbildung 24: 16q22-Deletion und Expression relevanter Proteine
 - Abbildung 25: Deletion und Amplifikation des Chromosoms 16 (ICGC/TCGA Dataset)
 - Abbildung 26: Daten zu 16q-Deletionen aus Studien mittels Comparative Genomic Hybridisation (CGH)

8. Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
3. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2016;59(4):651-72.
4. Sung JS, Lebron L, Keating D, D'Alessio D, Comstock CE, Lee CH, et al. Performance of Dual-Energy Contrast-enhanced Digital Mammography for Screening Women at Increased Risk of Breast Cancer. *Radiology.* 2019;293(1):81-8.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.
6. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33.
7. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(13):1460-8.
8. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:321-45.
9. Ramin C, Withrow D, Lynn BD, Gierach G, González ABd. Contralateral breast cancer risk according to first breast cancer characteristics among United States women from 1992 to 2015. *Journal of Clinical Oncology.* 2019;37(15_suppl):1549-.
10. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(11):1141-51.
11. Hormones and breast cancer. *Hum Reprod Update.* 2004;10(4):281-93.
12. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ. Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(8):515-25.
13. Tamimi RM, Spiegelman D, Smith-Warner SA, Wang M, Pazaris M, Willett WC, et al. Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *Am J Epidemiol.* 2016;184(12):884-93.
14. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1(2):109-26.
15. Sinn HP, Elsayaf Z, Helmchen B, Aulmann S. Early Breast Cancer Precursor Lesions: Lessons Learned from Molecular and Clinical Studies. *Breast Care (Basel).* 2010;5(4):218-26.
16. Perry MC. Breast Lump. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* Boston: Butterworths Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.; 1990.
17. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017;48:140-6.
18. Bower JE. Behavioral symptoms in patients with breast cancer and survivors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(5):768-77.

19. Fisher B, Fisher ER. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination: an experimental study. *Rev Inst Nac Cancerol (Mex)*. 1966;19:576-81.
20. Chatterjee G, Pai T, Hardiman T, Avery-Kiejda K, Scott RJ, Spencer J, et al. Molecular patterns of cancer colonisation in lymph nodes of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):143.
21. Patanaphan V, Salazar OM, Risco R. Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis. *South Med J*. 1988;81(9):1109-12.
22. Oeffinger KC, Fontham ET, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YC, et al. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *Jama*. 2015;314(15):1599-614.
23. World Health O. WHO position paper on mammography screening. Geneva: World Health Organization; 2014 2014.
24. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2020 AWMF Registernummer:032-045OL (abgerufen am: 28.08.2019).
25. Nelson HD, Fu R, Cantor A, Pappas M, Daeges M, Humphrey L. Effectiveness of Breast Cancer Screening: Systematic Review and Meta-analysis to Update the 2009 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. *Ann Intern Med*. 2016;164(4):244-55.
26. Hadad SM, Jordan LB, Roy PG, Purdie CA, Iwamoto T, Pusztai L, et al. A prospective comparison of ER, PR, Ki67 and gene expression in paired sequential core biopsies of primary, untreated breast cancer. *BMC cancer*. 2016;16(1):745-.
27. Gøtzsche PC, Jørgensen KJ. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2013(6):Cd001877.
28. Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2009;151(10):727-37, w237-42.
29. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review: A report jointly commissioned by Cancer Research UK and the Department of Health (England) October 2012. *Br J Cancer*. 1082013. p. 2205-40.
30. Sardanelli F, Fallenberg EM, Clauser P, Trimboli RM, Camps-Herrero J, Helbich TH, et al. Mammography: an update of the EUSOBI recommendations on information for women. *Insights Imaging*. 2017;8(1):11-8.
31. Sardanelli F, Aase HS, Álvarez M, Azavedo E, Baarslag HJ, Balleyguier C, et al. Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey. *Eur Radiol*. 2017;27(7):2737-43.
32. Rios N, Adaskina N, Frömke C, Papendorf F, Schippert C, Koch A, et al. The Benefit of Baseline Staging-Risk Assessment of Distant Breast Cancer Metastases by Tumor Stage. *Anticancer Res*. 2016;36(9):4909-14.
33. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, Brown PD, Alexander BM, Lin NU, et al. Implications of Screening for Brain Metastases in Patients With Breast Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(7):1001-3.
34. Corradini S, Reitz D, Pazos M, Schönecker S, Braun M, Harbeck N, et al. Mastectomy or Breast-Conserving Therapy for Early Breast Cancer in Real-Life Clinical Practice: Outcome Comparison of 7565 Cases. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).

35. Legendijk M, van Maaren MC, Saadatmand S, Strobbe LJA, Poortmans PMP, Koppert LB, et al. Breast conserving therapy and mastectomy revisited: Breast cancer-specific survival and the influence of prognostic factors in 129,692 patients. *Int J Cancer*. 2018;142(1):165-75.
36. Poortmans P. Evidence based radiation oncology: breast cancer. *Radiother Oncol*. 2007;84(1):84-101.
37. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-16.
38. Jones C, Lancaster R. Evolution of Operative Technique for Mastectomy. *Surg Clin North Am*. 2018;98(4):835-44.
39. Bromham N, Schmidt-Hansen M, Astin M, Hasler E, Reed MW. Axillary treatment for operable primary breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1(1):Cd004561.
40. Schick P, Goodstein J, Moor J, Butler J, Senter KL. Preoperative chemotherapy followed by mastectomy for locally advanced breast cancer. *J Surg Oncol*. 1983;22(4):278-82.
41. Sorace RA, Bagley CS, Lichter AS, Danforth DN, Wesley MW, Young RC, et al. The management of nonmetastatic locally advanced breast cancer using primary induction chemotherapy with hormonal synchronization followed by radiation therapy with or without debulking surgery. *World Journal of Surgery*. 1985;9(5):775-85.
42. Lordick F, Gockel I. Chances, risks and limitations of neoadjuvant therapy in surgical oncology. *Innov Surg Sci*. 2016;1(1):3-11.
43. 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):1687-717.
44. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1992;339(8784):1-15.
45. Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001(30):135-42.
46. Al jarroudi O, Zaimi A, Brahmi SA, Afqir S. Nottingham Prognostic Index is an Applicable Prognostic Tool in Non-Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(1):59-63.
47. Fong Y, Evans J, Brook D, Kenkre J, Jarvis P, Gower-Thomas K. The Nottingham Prognostic Index: five- and ten-year data for all-cause survival within a screened population. *Ann R Coll Surg Engl*. 2015;97(2):137-9.
48. Utada Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tada T, Saitoh M, Takahashi K, et al. The Location of Positive Nodes Partly Influences the Prognostic Value of the Number of Positive Nodes in Breast Cancer Patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 1999;29(2):63-7.
49. Si P, Zhang P, Chen T, Liu G, Lu H, Chen H, et al. Positive nonsentinel lymph nodes are associated with poor survival in breast cancer: results from a retrospective study. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(8):1085-92.
50. Noda S, Onoda N, Asano Y, Kurata K, Tokumoto M, Morisaki T, et al. Predictive factors for the occurrence of four or more axillary lymph node metastases in ER-positive and HER2-negative breast cancer patients with positive sentinel node: A retrospective cohort study. *Int J Surg*. 2016;26:1-5.

51. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. 1983;52(9):1551-7.
52. Mancino AT. Diseases of the Breast. *Ann Surg*. 2001;233(4):594-.
53. Mink D, von Tongelen B, Villena-Heinsen C, Heiss C, Schmidt W. Breast cancer and prognostic factors. Tumour size, degree of differentiation, proliferation kinetics and expression of steroid hormone receptors. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1994;15(6):424-36.
54. Schnürch HG, Bender HG, Beck L. The impact of morphological features on the prognosis of patients suffering from breast cancer. *Archives of gynecology*. 1985;237(2):75-83.
55. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359-77.
56. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(8):1048-52.
57. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3153-8.
58. Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(13):966-75.
59. Jung SY, Jung KW, Ha J, Won YJ, Kim YA, Kwon Y, et al. Different Patterns of Conditional Survival of Breast Cancer Patients by Age and Histologic Types: Evidence from the Korean Nationwide Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(7):1169-76.
60. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*. 2009;36(3):237-49.
61. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *British journal of cancer*. 2003;88(12):1900-8.
62. Kato T, Kimura T, Ishii N, Fujii A, Yamamoto K, Kameoka S, et al. The methodology of quantitation of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with long-term survival in Japanese patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53(1):19-31.
63. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(1):1-8.
64. Rakha EA, Martin S, Lee AH, Morgan D, Pharoah PD, Hodi Z, et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012;118(15):3670-80.
65. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ, Hutter RV. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer*. 1995;76(11):2266-74.
66. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*. 2000;89(2):111-7.

67. Lockwood CA, Ricciardelli C, Raymond WA, Seshadri R, McCaul K, Horsfall DJ. A simple index using video image analysis to predict disease outcome in primary breast cancer. *Int J Cancer*. 1999;84(3):203-8.
68. Esteban JM, Ahn C, Battifora H, Felder B. Quantitative immunohistochemical assay for hormonal receptors: technical aspects and biological significance. *J Cell Biochem Suppl*. 1994;19:138-45.
69. Stendahl M, Rydén L, Nordenskjöld B, Jönsson PE, Landberg G, Jirström K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12(15):4614-8.
70. Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hagerty KL, Mangu PB, Temin S, et al. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(3):214-63.
71. Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hanna WM. Cancer care Ontario guideline recommendations for hormone receptor testing in breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(10):684-96.
72. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003;21(10):1973-9.
73. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009;14(4):320-68.
74. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-6.
75. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-12.
76. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*. 1993;53(20):4960-70.
77. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
78. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(12):913-20.
79. Dovnik NF, Takac I. Prognostic significance of uPA/PAI-1 level, HER2 status, and traditional histologic factors for survival in node-negative breast cancer patients. *Radiol Oncol*. 2016;51(1):65-73.
80. Hwang K-T, Kim BH, Oh S, Park SY, Jung J, Kim J, et al. Prognostic Role of KRAS mRNA Expression in Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2019;22(4):548-61.
81. Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(40):e4975-e.
82. Lebok P, Huber J, Burandt EC, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, et al. Loss of membranous VEGFR1 expression is associated with an adverse phenotype and shortened survival in breast cancer. *Mol Med Rep*. 2016;14(2):1443-50.

83. Lebok P, von Hassel A, Meiners J, Hube-Magg C, Simon R, Höflmayer D, et al. Up-regulation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) is linked to poor prognosis in breast cancer. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(18):7796-804.
84. Lebok P, Kopperschmidt V, Kluth M, Hube-Magg C, Özden C, B T, et al. Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:963.
85. Lebok P, Mittenzwei A, Kluth M, Özden C, Taskin B, Hussein K, et al. 8p deletion is strongly linked to poor prognosis in breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(7):1080-7.
86. Sigbjörnsdóttir BI, Ragnarsson G, Agnarsson BA, Huiping C, Barkardóttir RB, Egilsson V, et al. Chromosome 8p alterations in sporadic and BRCA2 999del5 linked breast cancer. *J Med Genet*. 2000;37(5):342-7.
87. Borg A, Baldetorp B, Fernö M, Olsson H, Sigurdsson H. c-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer*. 1992;51(5):687-91.
88. Borg A, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Olsson H, et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *British journal of cancer*. 1991;63(1):136-42.
89. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev*. 1992;13(1):3-17.
90. Fatima A, Tariq F, Malik MFA, Qasim M, Haq F. Copy Number Profiling of MammaPrint™ Genes Reveals Association with the Prognosis of Breast Cancer Patients. *J Breast Cancer*. 2017;20(3):246-53.
91. Kuo S-H, Yang S-Y, You S-L, Lien H-C, Lin C-H, Lin P-H, et al. Polymorphisms of ESR1, UGT1A1, HCN1, MAP3K1 and CYP2B6 are associated with the prognosis of hormone receptor-positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(13):20925-38.
92. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(24):2838-47.
93. Cronin M, Sangli C, Liu ML, Pho M, Dutta D, Nguyen A, et al. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem*. 2007;53(6):1084-91.
94. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
95. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(2):111-21.
96. Hornberger J, Cosler LE, Lyman GH. Economic analysis of targeting chemotherapy using a 21-gene RT-PCR assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer. *Am J Manag Care*. 2005;11(5):313-24.
97. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu ML, et al. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24 Pt 1):8623-31.
98. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
99. Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert MC, Jauch A, et al. Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple

- amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol.* 1994;144(6):1203-18.
100. Luebke AM, Attarchi-Tehrani A, Meiners J, Hube-Magg C, Lang DS, Kluth M, et al. Loss of PSP94 expression is associated with early PSA recurrence and deteriorates outcome of PTEN deleted prostate cancers. *Cancer Biol Med.* 2019;16(2):319-30.
101. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012;181(2):401-12.
102. Kluth M, Scherzai S, Büschek F, Fraune C, Möller K, Höflmayer D, et al. 13q deletion is linked to an adverse phenotype and poor prognosis in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(10):504-12.
103. Kluth M, Jung S, Habib O, Eshagzaiy M, Heidl A, Amschler N, et al. Deletion lengthening at chromosomes 6q and 16q targets multiple tumor suppressor genes and is associated with an increasingly poor prognosis in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(65):108923-35.
104. Kluth M, Hesse J, Heidl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol.* 2013;26(7):975-83.
105. Kluth M, Ahrary R, Hube-Magg C, Ahmed M, Volta H, Schwemin C, et al. Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6(29):27966-79.
106. Kluth M, Amschler NN, Galal R, Möller-Koop C, Barrow P, Tsourlakis MC, et al. Deletion of 8p is an independent prognostic parameter in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(1):379-92.
107. Kluth M, Graunke M, Möller-Koop C, Hube-Magg C, Minner S, Michl U, et al. Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;7(52):86339-49.
108. Kluth M, Runte F, Barow P, Omari J, Abdelaziz ZM, Paustian L, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(10):2354-63.
109. Kluth M, Volta H, Hussein M, Taskin B, Frogh S, Möller-Koop C, et al. Deletion of 3p13 is a late event linked to progression of TMPRSS2:ERG fusion prostate cancer. *Cancer Manag Res.* 2018;10:5909-17.
110. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol.* 2013;231(1):130-41.
111. Ragnarsson G, Sigurdsson A, Eiriksdottir G, Barkardottir R, Jonasson J, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in human breast cancer. *Int J Oncol.* 1996;9(4):731-6.
112. Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer.* 1999;79(9-10):1468-74.
113. Janssen EA, Baak JP, Guervós MA, van Diest PJ, Jiwa M, Hermsen MA. In lymph node-negative invasive breast carcinomas, specific chromosomal aberrations are strongly associated with high mitotic activity and predict outcome more accurately than grade, tumour diameter, and oestrogen receptor. *J Pathol.* 2003;201(4):555-61.
114. Janssen EA, Øvestad IT, Skaland I, Søyland H, Gudlaugsson E, Kjellevoid KH, et al. LOH at 1p31 (ARHI) and proliferation in lymph node-negative breast cancer. *Cell Oncol.* 2009;31(5):335-43.

115. Borg A, Zhang QX, Olsson H, Wenngren E. Chromosome 1 alterations in breast cancer: allelic loss on 1p and 1q is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;5(4):311-20.
116. Seute A, Sinn HP, Schlenk RF, Emig R, Wallwiener D, Grischke EM, et al. Clinical relevance of genomic aberrations in homogeneously treated high-risk stage II/III breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2001;93(1):80-4.
117. Bièche I, Champème MH, Matifas F, Hacène K, Callahan R, Lidereau R. Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer. *Lancet*. 1992;339(8786):139-43.
118. Kristjansson AK, Eiriksdottir G, Ragnarsson G, Sigurdsson A, Gudmundsson J, Barkardottir RB, et al. Loss of heterozygosity at chromosome 7q in human breast cancer: association with clinical variables. *Anticancer Res*. 1997;17(1a):93-8.
119. Eiriksdottir G, Sigurdsson A, Jonasson JG, Agnarsson BA, Sigurdsson H, Gudmundsson J, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 9 in human breast cancer: association with clinical variables and genetic changes at other chromosome regions. *Int J Cancer*. 1995;64(6):378-82.
120. Lebok P, Roming M, Kluth M, Koop C, Özden C, Taskin B, et al. p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(49):81322-31.
121. Dellas A, Torhorst J, Schultheiss E, Mihatsch MJ, Moch H. DNA sequence losses on chromosomes 11p and 18q are associated with clinical outcome in lymph node-negative ductal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(5):1210-6.
122. Climent J, Dimitrow P, Fridlyand J, Palacios J, Siebert R, Albertson DG, et al. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67(2):818-26.
123. Winqvist R, Hampton GM, Mannermaa A, Blanco G, Alavaikko M, Kiviniemi H, et al. Loss of Heterozygosity for Chromosome 11 in Primary Human Breast Tumors Is Associated with Poor Survival after Metastasis. *Cancer Research*. 1995;55(12):2660-4.
124. Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Björnsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, et al. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer*. 1998;34(13):2076-81.
125. Andersen TI, Gaustad A, Ottestad L, Farrants GW, Nesland JM, Tveit KM, et al. Genetic alterations of the tumour suppressor gene regions 3p, 11p, 13q, 17p, and 17q in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;4(2):113-21.
126. Thompson AM, Crichton DN, Elton RA, Clay MF, Chetty U, Steel CM. Allelic imbalance at chromosome 17p13.3 (YNZ22) in breast cancer is independent of p53 mutation or p53 overexpression and is associated with poor prognosis at medium-term follow-up. *Br J Cancer*. 1998;77(5):797-800.
127. Nedelcheva Kristensen V, Andersen TI, Erikstein B, Geitvik G, Skovlund E, Nesland JM, et al. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics*. 1998;8(5):441-7.
128. Nagai MA, Pacheco MM, Brentani MM, Marques LA, Brentani RR, Ponder BA, et al. Allelic loss on distal chromosome 17p is associated with poor prognosis in a group of Brazilian breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1994;69(4):754-8.
129. Nagai MA, Medeiros AC, Brentani MM, Brentani RR, Marques LA, Mazoyer S, et al. Five distinct deleted regions on chromosome 17 defining different subsets of human primary breast tumors. *Oncology*. 1995;52(6):448-53.

130. Climent J, Martinez-Climent JA, Blesa D, Garcia-Barchino MJ, Saez R, Sánchez-Izquierdo D, et al. Genomic loss of 18p predicts an adverse clinical outcome in patients with high-risk breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(12):3863-9.
131. Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Ito T, Nishimura T, Minata M, et al. Prognostic impact of multiple allelic losses on metastatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Oncology.* 2002;62(2):141-8.
132. Kihana T, Yano N, Murao S, Iketani H, Hamada K, Yano J, et al. Allelic loss of chromosome 16q in endometrial cancer: correlation with poor prognosis of patients and less differentiated histology. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87(11):1184-90.
133. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Helou K, Horvath G. Analysis of cytogenetic alterations in stage III serous ovarian adenocarcinoma reveals a heterogeneous group regarding survival, surgical outcome, and substage. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;40(4):342-8.
134. Rogers HJ, Hsi ED, Tang G, Wang SA, Bueso-Ramos CE, Lubin D, et al. Most Myeloid Neoplasms With Deletion of Chromosome 16q Are Distinct From Acute Myeloid Leukemia With Inv(16)(p13.1q22): A Bone Marrow Pathology Group Multicenter Study. *Am J Clin Pathol.* 2017;147(4):411-9.
135. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, Ross FM, Johnson DC, Gonzalez D, et al. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood.* 2007;110(9):3291-300.
136. Messahel B, Williams R, Ridolfi A, A'Hern R, Warren W, Tinworth L, et al. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: a Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) Study. *Eur J Cancer.* 2009;45(5):819-26.
137. Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res.* 1994;54(9):2331-3.
138. Skotnicka-Klonowicz G, Rieske P, Bartkowiak J, Szymik-Kantorowicz S, Daszkiewicz P, Debiec-Rychter M. 16q heterozygosity loss in Wilms' tumour in children and its clinical importance. *Eur J Surg Oncol.* 2000;26(1):61-6.
139. Coco S, Valdora F, Bonassi S, Scaruffi P, Stigliani S, Oberthuer A, et al. Chromosome 9q and 16q loss identified by genome-wide pooled-analysis are associated with tumor aggressiveness in patients with classic medulloblastoma. *Omics.* 2011;15(5):273-80.
140. Ozaki T, Paulussen M, Poremba C, Brinkschmidt C, Rerin J, Ahrens S, et al. Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001;32(2):164-71.
141. Hansen LL, Yilmaz M, Overgaard J, Andersen J, Kruse TA. Allelic loss of 16q23.2-24.2 is an independent marker of good prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1998;58(10):2166-9.
142. Nordgard SH, Johansen FE, Alnaes GI, Bucher E, Syvänen AC, Naume B, et al. Genome-wide analysis identifies 16q deletion associated with survival, molecular subtypes, mRNA expression, and germline haplotypes in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(8):680-96.
143. Roylance R, Gorman P, Papior T, Wan YL, Ives M, Watson JE, et al. A comprehensive study of chromosome 16q in invasive ductal and lobular breast carcinoma using array CGH. *Oncogene.* 2006;25(49):6544-53.
144. Hislop RG, Pratt N, Stocks SC, Steel CM, Sales M, Goudie D, et al. Karyotypic aberrations of chromosomes 16 and 17 are related to survival in patients with breast cancer. *Br J Surg.* 2002;89(12):1581-6.

145. Zudaire I, Odero MD, Caballero C, Valenti C, Martínez-Penuela JM, Isola J, et al. Genomic imbalances detected by comparative genomic hybridization are prognostic markers in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*. 2002;40(6):547-55.
146. Cleton-Jansen AM, Callen DF, Seshadri R, Goldup S, McCallum B, Crawford J, et al. Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res*. 2001;61(3):1171-7.
147. Cleton-Jansen AM, Buerger H, Haar N, Philippo K, van de Vijver MJ, Boecker W, et al. Different mechanisms of chromosome 16 loss of heterozygosity in well- versus poorly differentiated ductal breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41(2):109-16.
148. Tsuda H, Sakamaki C, Shimamura K, Hirohashi S. Detection of allele loss on chromosome 16q in DNA isolated from fine needle aspiration specimens of breast tumors. A simulation study using surgically resected specimens. *Acta Cytol*. 1996;40(4):625-30.
149. Sato T, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res*. 1991;51(21):5794-9.
150. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. *Trends Genet*. 2001;17(10):569-73.
151. Downing TE, Oktay MH, Fazzari MJ, Montagna C. Prognostic and predictive value of 16p12.1 and 16q22.1 copy number changes in human breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198(1):52-61.
152. Callen DF, Crawford J, Derwas C, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ, Baker E. Defining regions of loss of heterozygosity of 16q in breast cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;133(1):76-82.
153. Tsuda H, Takarabe T, Susumu N, Inazawa J, Okada S, Hirohashi S. Detection of numerical and structural alterations and fusion of chromosomes 16 and 1 in low-grade papillary breast carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *The American journal of pathology*. 1997;151(4):1027-34.
154. Sartore-Bianchi A, Fieuws S, Veronese S, Moroni M, Personeni N, Frattini M, et al. Standardisation of EGFR FISH in colorectal cancer: results of an international interlaboratory reproducibility ring study. *J Clin Pathol*. 2012;65(3):218-23.
155. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323-33.
156. Varga Z, Noske A, Ramach C, Padberg B, Moch H. Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC Cancer*. 2013;13:615.
157. Selvarajan S, Bay BH, Choo A, Chuah KL, Sivaswaren CR, Tien SL, et al. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(12):1693-6.
158. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(3):312-9.
159. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1245-51.
160. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000;80(12):1943-9.

161. Eskaros ARH, Egloff SAA, Boyd KL, Richardson JE, Hyndman ME, Zijlstra A. Larger core size has superior technical and analytical accuracy in bladder tissue microarray. *Laboratory Investigation*. 2017;97(3):335-42.
162. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *The American journal of pathology*. 2001;159(6):2249-56.
163. Kononen J, Bubendorf L, Kallionimeni A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998;4(7):844-7.
164. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, et al. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2190-4.
165. Hunt JL. Chapter 5 - Loss of Heterozygosity. In: Tubbs RR, Stoler MH, editors. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p. 50-5.
166. Mancini M, Cedrone M, Diverio D, Emanuel B, Stul M, Vranckx H, et al. Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients. *Leukemia*. 2000;14(3):364-8.
167. Jobanputra V, Kriplani A, Choudhry V, Kucheria K. Detection of chromosomal abnormalities using fluorescence in situ hybridization (FISH). *The National medical journal of India*. 1998;11:259-63.
168. Summersgill B, Clark J, Shipley J. Fluorescence and chromogenic in situ hybridization to detect genetic aberrations in formalin-fixed paraffin embedded material, including tissue microarrays. *Nature Protocols*. 2008;3(2):220-34.
169. Wolman SR. Applications of fluorescence in situ hybridization techniques in cytopathology. *Cancer*. 1997;81(4):193-7.
170. Skirnisdottir S, Eiriksdottir G, Baldursson T, Barkardottir RB, Egilsson V, Ingvarsson S. High frequency of allelic imbalance at chromosome region 16q22-23 in human breast cancer: correlation with high PgR and low S phase. *Int J Cancer*. 1995;64(2):112-6.
171. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo j*. 1995;14(24):6107-15.
172. Lindblom A, Rotstein S, Skoog L, Nordenskjöld M, Larsson C. Deletions on chromosome 16 in primary familial breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Cancer Res*. 1993;53(16):3707-11.
173. Dorion-Bonnet F, Mautalen S, Hostein I, Longy M. Allelic imbalance study of 16q in human primary breast carcinomas using microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;14(3):171-81.
174. Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ, Callen DF, Sutherland GR, Hansen B, et al. At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;9(2):101-7.
175. Tsuda H, Callen DF, Fukutomi T, Nakamura Y, Hirohashi S. Allele loss on chromosome 16q24.2-qter occurs frequently in breast cancers irrespectively of differences in phenotype and extent of spread. *Cancer Res*. 1994;54(2):513-7.
176. Caligo MA, Polidoro L, Ghimenti C, Campani D, Cecchetti D, Bevilacqua G. A region on the long arm of chromosome 16 is frequently deleted in metastatic node-negative breast cancer. *Int J Oncol*. 1998;13(1):177-82.

177. Driouch K, Dorion-Bonnet F, Briffod M, Champéme MH, Longy M, Lidereau R. Loss of heterozygosity on chromosome arm 16q in breast cancer metastases. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;19(3):185-91.
178. Takita K, Sato T, Miyagi M, Watatani M, Akiyama F, Sakamoto G, et al. Correlation of loss of alleles on the short arms of chromosomes 11 and 17 with metastasis of primary breast cancer to lymph nodes. *Cancer Res*. 1992;52(14):3914-7.
179. Larsson C, Byström C, Skoog L, Rotstein S, Nordenskjöld M. Genomic alterations in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990;2(3):191-7.
180. Tsuda H, Hirohashi S. Identification of multiple breast cancers of multicentric origin by histological observations and distribution of allele loss on chromosome 16q. *Cancer Res*. 1995;55(15):3395-8.
181. Deng G, Chen LC, Schott DR, Thor A, Bhargava V, Ljung BM, et al. Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 1994;54(2):499-505.
182. Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, et al. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50(22):7184-9.
183. Chalmers IJ, Aubele M, Hartmann E, Braungart E, Werner M, Höfler H, et al. Mapping the chromosome 16 cadherin gene cluster to a minimal deleted region in ductal breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;126(1):39-44.
184. Rosenthal SI, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS. Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in lobular and ductal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(1):40-6.
185. Ciriello G, Gatz ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhee SK, Pastore A, et al. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*. 2015;163(2):506-19.
186. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*. 2012;486(7403):353-60.
187. Grabenstetter A, Mohanty AS, Rana S, Zehir A, Brannon AR, D'Alfonso TM, et al. E-cadherin immunohistochemical expression in invasive lobular carcinoma of the breast: correlation with morphology and CDH1 somatic alterations. *Hum Pathol*. 2020;102:44-53.
188. Desmedt C, Zoppoli G, Gudem G, Pruneri G, Larsimont D, Fornili M, et al. Genomic Characterization of Primary Invasive Lobular Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(16):1872-81.
189. Ping Z, Siegal GP, Harada S, Eltoum IE, Youssef M, Shen T, et al. ERBB2 mutation is associated with a worse prognosis in patients with CDH1 altered invasive lobular cancer of the breast. *Oncotarget*. 2016;7(49):80655-63.
190. Iida A, Isobe R, Yoshimoto M, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M. Localization of a breast cancer tumour-suppressor gene to a 3-cM interval within chromosomal region 16q22. *Br J Cancer*. 1997;75(2):264-7.
191. Wang ZC, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, et al. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res*. 2004;64(1):64-71.
192. Farabegoli F, Hermsen MAJA, Ceccarelli C, Santini D, Weiss MM, Meijer GA, et al. Simultaneous chromosome 1q gain and 16q loss is associated with steroid receptor presence and low proliferation in breast carcinoma. *Modern Pathology*. 2004;17(4):449-55.
193. Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Marchio C, Tan DS, Vatcheva R, et al. Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: Evidence

- for progression in tumors with a luminal phenotype? *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(4):351-65.
194. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013;73(9):2795-805.
195. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *The American journal of pathology*. 1993;143(6):1731-42.
196. Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, Walsh FS, Millis RR. Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J Pathol*. 1993;169(2):245-50.
197. Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer*. 2001;92(3):404-8.
198. Matsuo K, Satoh S, Okabe H, Nomura A, Maeda T, Yamaoka Y, et al. SIAH1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36(3):283-91.
199. Hess J, Unger K, Orth M, Schötz U, Schüttrumpf L, Zangen V, et al. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett*. 2017;386:87-99.
200. Rosen N, V. Chalifa-Caspi, O. Shmueli, A. Adato, M. Lapidot, J. Stampnitzky, M. Safran, and D. Lancet GeneLoc: Exon-based integration of human genome maps. *Bioinformatics* 19(S1). 2003 [Available from: <http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc>.
201. Hungermann D, Schmidt H, Natrajan R, Tidow N, Poos K, Reis-Filho JS, et al. Influence of whole arm loss of chromosome 16q on gene expression patterns in oestrogen receptor-positive, invasive breast cancer. *J Pathol*. 2011;224(4):517-28.
202. Solimini NL, Xu Q, Mermel CH, Liang AC, Schlabach MR, Luo J, et al. Recurrent hemizygous deletions in cancers may optimize proliferative potential. *Science*. 2012;337(6090):104-9.
203. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-3.
204. Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, Sack LM, Yoon JC, Park PJ, et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*. 2013;155(4):948-62.
205. Berger AH, Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):137-46.
206. Hwang ES, DeVries S, Chew KL, Moore DH, 2nd, Kerlikowske K, Thor A, et al. Patterns of chromosomal alterations in breast ductal carcinoma in situ. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5160-7.
207. Gronwald J, Jauch A, Cybulski C, Schoell B, Böhm-Steuer B, Lener M, et al. Comparison of genomic abnormalities between BRCA1 and sporadic breast cancers studied by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*. 2005;114(2):230-6.
208. Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;21(3):177-84.
209. Weber-Mangal S, Sinn HP, Popp S, Klaes R, Emig R, Bentz M, et al. Breast cancer in young women (< or = 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*. 2003;107(4):583-92.
210. Jong YJ, Li LH, Tsou MH, Chen YJ, Cheng SH, Wang-Wuu S, et al. Chromosomal comparative genomic hybridization abnormalities in early- and late-onset

- human breast cancers: correlation with disease progression and TP53 mutations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;148(1):55-65.
211. Nishizaki T, Chew K, Chu L, Isola J, Kallioniemi A, Weidner N, et al. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer.* 1997;74(5):513-7.
212. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, et al. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol.* 1999;187(4):396-402.
213. Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkötter U, et al. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol.* 2010;23(4):603-10.
214. Burandt E, Jens G, Holst F, Jänicke F, Müller V, Quaas A, et al. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(3):745-53.
215. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(23):8534-40.
216. Al-Kuraya K, Schraml P, Sheikh S, Amr S, Torhorst J, Tapia C, et al. Predominance of high-grade pathway in breast cancer development of Middle East women. *Mod Pathol.* 2005;18(7):891-7.
217. Choschzick M, Heilenkötter U, Lebeau A, Jaenicke F, Terracciano L, Bokemeyer C, et al. MDM2 amplification is an independent prognostic feature of node-negative, estrogen receptor-positive early-stage breast cancer. *Cancer Biomark.* 2010;8(2):53-60.
218. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet.* 2007;39(5):655-60.
219. Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, et al. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2323-33.
220. Burandt E, Bari Noubar T, Lebeau A, Minner S, Burdelski C, Jänicke F, et al. Loss of ALCAM expression is linked to adverse phenotype and poor prognosis in breast cancer: a TMA-based immunohistochemical study on 2,197 breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2628-34.
221. Thewes V, Simon R, Hlevnjak M, Schlotter M, Schroeter P, Schmidt K, et al. The branched-chain amino acid transaminase 1 sustains growth of antiestrogen-resistant and ER α -negative breast cancer. *Oncogene.* 2017;36(29):4124-34.
222. Lebok P, Öztürk M, Heilenkötter U, Jaenicke F, Müller V, Paluchowski P, et al. High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(3):1987-94.
223. Gromova I, Gromov P, Kroman N, Wielenga VT, Simon R, Sauter G, et al. Immunoexpression analysis and prognostic value of BLCAP in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(9):e45967.
224. Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschênes J, Sauter G, Simon R, et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97(3):275-83.
225. Harrison JC, Haber JE. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet.* 2006;40:209-35.
226. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer.* 2002;2(11):815-25.
227. Elo JP, Härkönen P, Kyllönen AP, Lukkarinen O, Vihko P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-

q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. *Br J Cancer*. 1999;79(1):156-60.

228. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116(15):e56-65.

229. Spreafico F, Gamba B, Mariani L, Collini P, D'Angelo P, Pession A, et al. Loss of heterozygosity analysis at different chromosome regions in Wilms tumor confirms 1p allelic loss as a marker of worse prognosis: a study from the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *J Urol*. 2013;189(1):260-6.

230. Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, et al. Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol*. 1998;153(5):1467-73.

231. He Q, Wu J, Liu XL, Ma YH, Wu XT, Wang WY, et al. Clinicopathological and prognostic significance of cyclin D1 amplification in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J buon*. 2017;22(5):1209-16.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Guido Sauter für die Vergabe dieses Dissertationsthemas und für die Möglichkeit die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Darüber hinaus möchte ich ihm meinen besonderen Dank aussprechen für eine gute und intensive Betreuung und die Zeit, die er sich für meine Arbeit genommen hat.

Mein Dank geht an Dr. Martina Kluth, die mir zu Beginn praktische Hilfe und Ratschläge zu dieser Arbeit gegeben hat.

Herrn Professor Dr. Ronald Simon möchte ich danken für die fachliche Unterstützung und Betreuung meiner Dissertation.

Christina Möller-Koop danke ich vor allem für die gute Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit im Labor und im Archiv. Melanie Witt danke ich für ihre Unterstützung aus dem TMA-Labor.

Zuletzt danke ich ganz herzlich meiner Familie und meinen Freunden für ihren Zuspruch und ihre stetige und uneigennützig Unterstützung, die mir die Arbeit an dieser Dissertation erst möglich gemacht haben und mir die Kraft gaben, sie fertig zu stellen.

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift

