

**Molekularzytogenetische  
Untersuchungen von Vorstufen des  
Mammakarzinoms**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ulrike Montag**  
aus Wismar

Mai, 2010

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01.10.2001 bis 31.12.2005 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Evelin Schröck angefertigt am

Institut für Medizinische Genetik der Charité  
AG Tumorzytogenetik und Molekulare Zytogenetik  
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin  
Leitung der Arbeitsgruppe: Frau Prof. Dr. Evelin Schröck

und am

Institut für Klinische Genetik  
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden  
Leitung des Instituts: Frau Prof. Dr. Evelin Schröck

Erster Gutachter: Prof. Dr. Carsten Niemitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Evelin Schröck

Disputation am: 23.09.2010

## Danksagung

Frau Prof. Dr. Evelin Schröck danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung in Berlin und Dresden sowie die Begutachtung der Arbeit. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Evelin Schröck ganz besonders für Ihren Einsatz zur Finanzierung meiner Stelle, die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen teilnehmen zu können und die Freiräume beim selbständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Carsten Niemitz möchte ich sehr herzlich für die Bereitschaft, sich als Erstgutachter meiner Dissertation zur Verfügung zu stellen, danken. Außerdem bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in seinem Team und die hilfreichen Korrekturvorschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Gustavo Baretton und ganz besonders bei Frau Dr. Katrin Friedrich bedanke ich mich für die Bereitstellung von archivierten Tumorproben, inklusive deren umfangreicher histopathologischer Begutachtung. Die zahlreichen fachlichen Diskussionen zum Mammakarzinom und die vielen praktischen Hinweise zur Auswertung haben sehr geholfen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Rüdiger Steinbeck für die finanzielle Unterstützung meiner Stelle für ein Jahr, der Bereitstellung von Tumorproben sowie der Möglichkeit, vor Ort die immunhistochemischen Färbungen und DNA-zytometrischen Untersuchungen durchführen zu können. Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. Sabine Steinhoff für die unkomplizierte Zusammenarbeit und Unterstützung während der gesamten Zeit sowie dem gesamten Team, das stets für mich da war.

Bei Herrn Prof. Dr. Christoph Klein, Dr. Nikolas Stöcklein, Dr. Oleg Schmidt-Kittler und Herrn Manfred Meyer möchte ich mich ganz herzlich für das Know-how rund um die Ligations-PCR, die anregenden Diskussionen und die schöne Zeit in München bedanken.

Frau Dr. Esmeralda Heiden danke ich sehr für die Unterstützung bei der Etablierung der Laser-Mikrodissektion an Paraffinmaterial, dem unermüdlichen Einzeichnen sämtlicher Tumoreale und der Beantwortung vieler Fragen zur Histopathologie und Klinik. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Heiden für die hilfreichen Diskussionen während der gesamten Zeit, die wertvollen Anregungen rund um die Ergebnisauswertung und das kritische Lesen erster Entwürfe. Herrn Prof. Dr. Jürgen Kunz danke ich ebenfalls sehr herzlich für das Lesen der Arbeit, die wertvollen Hinweise und die Motivation. Frau Dr. Friederike Siedentopf sei für die Beantwortung klinischer Fragen zur Therapie und dem Lesen einzelner Kapitel gedankt.

Für die gute Zusammenarbeit und die intensiven Diskussionen bedanke ich mich sehr herzlich bei den ehemaligen Kollegen Anja Stadler, Frau Karen Stout-Weider, Dr. Eva Klopocki, Dr. Tanja Hardt, Dr. Alexander Herr, Dr. Andreas Rump, Dr. Isabell Grandy, Dr. Anne Helmrich, Dr. Barbara Klink und Frau Eva Gerlach.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1	DAS MAMMAKARZINOM .....	8
1.1.1	Allgemeine Betrachtungen zum Mammakarzinom .....	8
1.1.2	Anatomie, Pathologie, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms .....	9
1.1.3	Genomische Charakterisierung des Mammakarzinoms .....	15
1.1.4	Pathogenese - Stammzell-Hypothese und Multistep-Modell .....	17
1.1.5	Genomische Veränderungen unterschiedlicher Tumorstadien.....	20
1.2	METHODEN ZUR GENOMISCHEN CHARAKTERISIERUNG DES MAMMAKARZINOMS .....	21
1.2.1	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) .....	21
1.2.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) .....	22
1.3	ZIELSTELLUNG.....	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
2.1	PATIENTENMATERIAL .....	28
2.2	IMMUNHISTOCHEMIE .....	31
2.2.1	Herstellung der Präparate und immunhistochemische Färbung.....	31
2.2.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	32
2.3	DNA-ZYTOTOMETRIE.....	33
2.3.1	Feulgen-Färbung.....	33
2.3.2	DNA-Messung und Histogramm-Auswertung .....	33
2.4	LASER-MIKRODISSEKTION VON TUMORZELLEN.....	34
2.4.1	Vorbereitung von Folien-Objektträgern .....	34
2.4.2	Herstellung von Paraffinschnitten und Färbung.....	34
2.4.3	Laser-Mikrodissektion .....	35
2.5	GENOMAMPLIFIKATION MIT LIGATIONS-PCR.....	35
2.5.1	Proteinase K-Verdau .....	36
2.5.2	Mse I-Verdau.....	36
2.5.3	Primer-Preannealing .....	36
2.5.4	Ligation der Adaptoren.....	36
2.5.5	Primäre PCR .....	37
2.6	WEITERE METHODEN ZUR AMPLIFIKATION GENOMISCHER DNA .....	37
2.6.1	DOP-PCR.....	37
2.6.2	« Multiple Strand Displacement Amplification » und DNA-Markierung.....	38
2.7	DNA-EXTRAKTION AUS PARAFFINSCHNITTEN.....	39
2.8	DNA-EXTRAKTION AUS LYMPHOZYTEN UND DER ZELLINIE SKBR3.....	40
2.9	KONVENTIONELLE CGH-ANALYSE.....	40
2.9.1	Chromosomenpräparation für FISH-Experimente.....	40
2.9.2	Vorbehandlung und Denaturierung der Metaphasenpräparate .....	41
2.9.3	DNA-Markierung durch Ligations-PCR .....	42
2.9.4	DNA-Markierung durch DOP-PCR.....	42
2.9.5	DNA-Markierung durch Nick Translation.....	43
2.9.6	Fällung und Denaturierung der Sonden .....	44
2.9.7	Hybridisierung und Detektion .....	44

2.9.8	Bildaufnahme und Auswertung der CGH-Experimente .....	45
2.10	HIERARCHISCHE CLUSTERANALYSE ALLER CGH-DATEN .....	46
2.11	ARRAY-CGH-ANALYSE.....	47
2.11.1	DNA- Markierung durch Random Priming.....	47
2.11.2	DNA-Markierung durch Ligations-PCR .....	48
2.11.3	Kontroll-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität.....	48
2.11.4	Vorbereitung der DNA-Sonden und der Prähybridisierungslösung .....	49
2.11.5	Vorbehandlung der Chips.....	49
2.11.6	Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Arrays .....	50
2.11.7	Scannen der Hybridisierungssignale und Auswertung der Daten.....	50
2.12	INTERPHASE-FISH .....	51
2.12.1	Herstellung von Imprints, Zytopsin- und Schnittpräparaten .....	51
2.12.2	Vorbehandlung der Präparate .....	52
2.12.3	Auswahl von BACs zur Generierung von FISH-Sonden.....	52
2.12.4	DNA-Gewinnung durch Maxipräparation .....	53
2.12.5	Kombination der FISH-Sonden zu Sondensets .....	54
2.12.6	Markierung der BAC-DNA und Präzipitation .....	55
2.12.7	Denaturierung, Hybridisierung und Detektion .....	56
2.12.8	Bildaufnahme und Auswertung der FISH-Signale.....	56
2.13	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND BERECHNUNGEN .....	57
2.14	CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIAL UND GERÄTE .....	58
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
3.1	METHODISCHER VERGLEICH ZUR AMPLIFIKATION UND MARKIERUNG GENOMISCHER DNA FÜR KONVENTIONELLE CGH-ANALYSEN.....	63
3.1.1	DOP- und Ligations-PCR .....	63
3.1.2	« Multiple Strand Displacement Amplification » (MDA) .....	66
3.2	VERGLEICH DIREKTER DNA- MARKIERUNGSMETHODEN FÜR ARRAY-CGH- UNTERSUCHUNGEN .....	69
3.2.1	Direkte DNA-Markierung - Hybridisierung auf Metaphasen.....	69
3.2.2	Vergleich von Random Priming und Markierungs-PCR - Hybridisierung auf DNA- Chips.....	73
3.3	KONVENTIONELLE CGH-ANALYSE VON VORLÄUFERLÄSIONEN UND KARZINOMEN .....	78
3.3.1	CGH-Analyse von atypisch duktalem Hyperplasien (ADH) .....	78
3.3.2	CGH-Analyse von duktalem Carcinoma in situ (DCIS) mit unterschiedlicher Differenzierung .....	79
3.3.3	CGH-Analyse von lobulären Carcinoma in situ (LCIS) .....	85
3.3.4	CGH-Analyse autologer Gewebeprobe.....	86
3.3.5	CGH-Ergebnisse von normalem Brustepithel .....	87
3.3.6	CGH-Ergebnisse invasiv duktales (IDC) und invasiv lobulärer Karzinome (ILC) ....	89
3.4	HIERARCHISCHE CLUSTERANALYSE ALLER CGH-ERGEBNISSE.....	91
3.4.1	Cluster 1 „normal“, n = 22 (26 %).....	92
3.4.2	Cluster 2 „wenig aberrant“, n = 6 (7 %).....	92
3.4.3	Cluster 3 „stark aberrant“, n = 23 (27 %).....	92
3.4.4	Cluster 4 „Aberration 1q/ 16q“, n = 28 (33 %) .....	96
3.4.5	Cluster 5 „Aberration 4/ 17“, n = 4 (5 %) .....	97
3.4.6	Verbindung der Cluster mit klinischen- und histopathologischen Daten.....	97
3.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER TUMORSTADIEN .....	100

3.5.1	Hormonrezeptoren (ER und PgR) .....	101
3.5.2	Zellproliferation (Ki-67) .....	104
3.5.3	Überexpression von HER-2/neu und Vergleich zur Amplifikation von Her-2/neu mittels CGH-Techniken .....	104
3.6	DNA-ZYTOMETRISCHE ANALYSEN.....	106
3.7	ARRAY-CGH-ANALYSE AN AUSGEWÄHLTEN DCIS .....	110
3.7.1	DNA-Qualität und Auswertbarkeit der Array-CGH-Analysen .....	110
3.7.2	Vergleich der Ergebnisse aus konventioneller und Array-CGH .....	111
3.7.3	Rekurrente Aberrationen und Regionen mit Amplifikationen .....	114
3.7.4	Untersuchung der Amplifikation 14q12-q21 .....	116
3.8	GENERIERUNG LOKUSSPEZIFISCHER FISH-SONDEN ZUR BRUSTKREBSDIAGNOSTIK .....	117
3.8.1	Methodische Aspekte zur optimalen FISH-Diagnostik .....	117
3.8.2	Interphase-FISH- und CGH-Ergebnisse im Vergleich .....	118
3.8.3	Sensitivität des generierten FISH-Sondensets zur Diagnostik .....	123
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>126</b>
4.1	METHODEN ZUR AMPLIFIKATION UND MARKIERUNG GENOMISCHER DNA AN FORMALINFIXIERTEM GEWEBE .....	127
4.1.1	DOP- und Ligations-PCR .....	127
4.1.2	„Multiple Stand Displacement Amplification“ .....	128
4.1.3	Weitere Methoden zur Genomamplifikation .....	130
4.2	METHODEN ZUR DIREKTEN DNA-MARKIERUNG UND WICHTIGE VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE ARRAY-CGH-ANALYSE.....	131
4.2.1	Direkte DNA-Markierungsmethoden für die Array-CGH-Analyse .....	131
4.2.2	Qualität der Test-DNA .....	132
4.2.3	Qualität des Hybridisierungstargets .....	133
4.3	CGH- UND CLUSTERANALYSE VON NORMALEM EPITHEL, VORLÄUFERLÄSIONEN, IN SITU- UND INVASIVEN KARZINOMEN .....	134
4.3.1	CGH-Ergebnisse von normalem Epithel angrenzend zum Tumor.....	135
4.3.2	CGH-Ergebnisse von ADH, in situ- und invasiven Karzinomen.....	136
4.3.3	Clusteranalyse der CGH-Daten und Prognose .....	141
4.4	ARRAY-CGH-ANALYSE.....	143
4.4.1	Array-CGH-Analyse an ausgewählten DCIS.....	144
4.4.2	Amplifikation der Region 14q12-q21 .....	145
4.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER TUMORSTADIEN .....	149
4.5.1	Hormonrezeptorstatus (ER und PgR) .....	149
4.5.2	Zellproliferation (Ki-67) .....	150
4.5.3	Überexpression von HER-2/neu und Vergleich zur Amplifikation mittels CGH- Techniken .....	151
4.6	DNA-ZYTOMETRISCHE ANALYSEN .....	152
4.7	ANWENDUNG LOKUSSPEZIFISCHER FISH-SONDEN ZUR BRUSTKREBSDIAGNOSTIK .....	156
4.7.1	Eingesetzte FISH-Sonden und Funktion der überspannten Gene.....	156
4.7.2	Optimierung der Interphasezytogenetik und Anwendung der FISH-Sonden an Gewebeschnitten.....	158
4.7.3	Spezifität des verwendeten FISH-Sonden-Mix .....	159
4.7.4	Optimierung des FISH-Sondensets und dessen Grenzen.....	161
4.7.5	Mögliche Anwendungsgebiete des generierten FISH-Sondensets.....	162
4.8	AUSBLICK.....	164

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>166</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>168</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>170</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>181</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>182</b>
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	182
9.2	KLINISCHE UND HISTOPATHOLOGISCHE PATIENTENDATEN.....	184
9.3	GENETISCHE ABERRATIONEN NACH KONVENTIONELLER CGH .....	185
9.4	GENETISCHE ABERRATIONEN AUSGEWÄHLTER DCIS - ARRAY-CGH UND KONVENTIONELLE CGH IM VERGLEICH .....	188
9.5	KOOPERATIONSPARTNER .....	192
9.6	ERKLÄRUNG .....	193

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Allgemeine Betrachtungen zum Mammakarzinom

Mit dem Wort „Krebs“ oder Karzinom bezeichnet man bösartige Wucherungen von Zellen, die sich unkontrolliert vermehren und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören. Das Mammakarzinom (*Carcinoma mammae*) ist die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Durchschnittlich jede elfte Frau ist im Verlaufe ihres Lebens betroffen, am häufigsten um das 62. Lebensjahr. In Deutschland ist die Inzidenz seit 1970 stetig angestiegen und die Sterblichkeitsrate erst seit Mitte der 1990er Jahre leicht rückläufig. Nach Angaben des Robert Koch Instituts werden gegenwärtig jährlich 55.100 Neuerkrankungen verzeichnet. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate der Patientinnen beträgt insgesamt 79 %. Um die trotz medizinischer und wissenschaftlicher Bemühungen in Deutschland nur gering rückläufige Mortalität weiter zu senken, wurden zertifizierte, besonders spezialisierte Tumorzentren aufgebaut und ein flächendeckendes Mammographie-Screening eingeführt. Ziel dieser Reihenuntersuchungen ist es, Brustkrebs in einem möglichst frühen Stadium, insbesondere zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr, zu diagnostizieren, um dadurch die Heilungschancen zu verbessern und die Sterblichkeit zu verringern. Nach Angaben deutscher Krebsregister ist die Zahl früher Tumorstadien in den letzten Jahren erheblich angestiegen.

Brustkrebs tritt entweder bedingt durch eine familiäre Prädisposition oder sporadisch auf. Etwa 5-10 % aller Brusttumore lassen sich auf genetische Faktoren wie z. B. Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PTEN* oder *TP53* zurückführen (Blackwood & Weber, 1998). Besonders hoch (zirka 80 %) ist das Brustkrebsrisiko bei Trägerinnen genomischer Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* (Tyczynski *et al.*, 2002). Die Mehrheit der Brusttumore, etwa 90-95 %, tritt jedoch sporadisch auf. Mit höherem Lebensalter steigt die Inzidenz solider Tumorerkrankungen, da sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass mehrere somatische Mutationen in einer Zelle auftreten. Zu den nicht genetisch bedingten Risikofaktoren gehören das Lebensalter, ein bereits vorausgegangenes Mammakarzinom, reproduktive Faktoren wie frühe Menarche, späte Erstschwangerschaft, späte Menopause und ungesunder Lebensstil wie z. B. übermäßiger Alkoholkonsum, Rauchen und Übergewicht. Viele der Faktoren stehen in engem Zusammenhang mit einem erhöhten Östrogenspiegel.

In verschiedenen Studien wurde zudem ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nach Hormonersatztherapie zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden festgestellt, was in der letzten Zeit zu kontroversen Diskussionen geführt hat, denn es ist nicht gesichert, ob solch eine Therapie sinnvoll ist (Rossouw *et al.*, 2002; Beral, 2003).

### 1.1.2 Anatomie, Pathologie, Diagnostik und Therapie des Mamma-karzinoms

Die Brust einer fertilen Frau besteht aus einem in Fettgewebe eingebetteten Drüsenkörper, in dem sich das Milchgangsystem verzweigt (siehe Abbildung 1.1). Er setzt sich aus 15 bis 20 radiär zur Mamille (Brustwarze) angeordneten Drüsenlappen zusammen. Diese sind in Fasergewebe eingehüllt und lassen sich weiter in Lobuli aufgliedern. Die feinsten Gänge, die terminalen Ductuli, enden in den Azini. Sie bilden die Drüsenendstücke, in denen während der Laktationsperiode die Milch sezerniert wird. Die terminalen Ductuli münden in größere intra- und extralobuläre Ducti und führen schließlich zum Ductus excretorius, der an der Oberfläche der Brustwarze (Mamille) austritt.

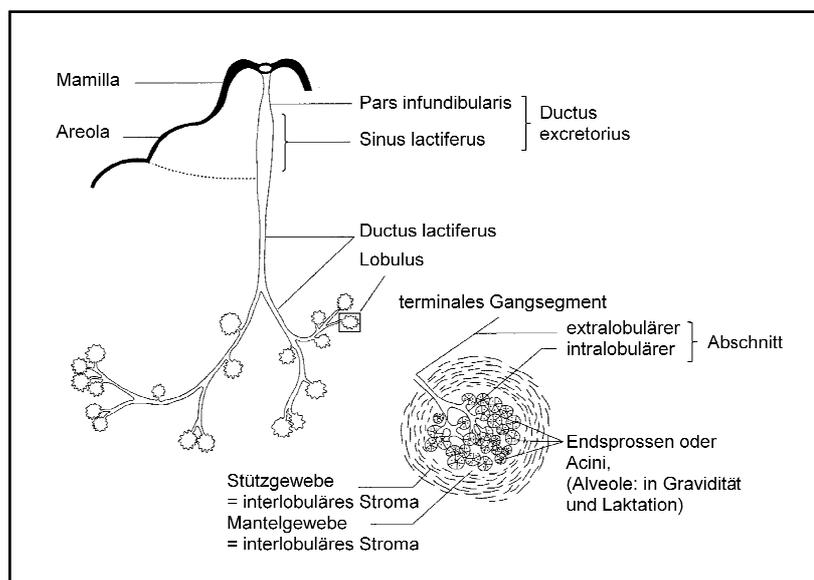


Abbildung 1.1: Anatomie des Milchgangsystems nach Meuret (1995)

#### 1.1.2.1 Benigne Brustveränderungen

Tumorartige Läsionen können durch hormonelle Fehlstimulation bzw. abnorme Reaktionsbereitschaft mesenchymaler oder epithelialer Mammastrukturen ausgelöst werden. Klinisch und pathologisch-anatomisch finden sich Zystenbildung und regressive Veränderungen, die sich als Knotenbildung zeigen. Die **fibrozystische Mastopathie** zählt zu den häufigsten gutartigen (benignen) Veränderungen der weiblichen Brust. Charakteristisch sind Umbauvorgänge in der Brustdrüse wie zystisch erweiterte Milchgänge, krankhafte Vermehrung von Bindegewebe mit palpablen Verhärtungen (Fibrose) und epitheliale Proliferationen (apokrine Metaplasie) in unterschiedlicher Ausprägung, die von prämaligen und malignen Veränderungen diagnostisch abgegrenzt werden müssen.

Hyperplasien gehören ebenfalls zu benignen Veränderungen der Brust, bei denen das intraduktale oder intralobuläre Epithel proliferiert und es bereits zu Abweichungen der Gewebestruktur vom normalen histologischen Bild kommt. Erweiterungen der

Milchgänge führen zu einer **duktalen Hyperplasie**. Tritt die Zellproliferation in einem Teil der Azini eines Lobulus auf, handelt es sich um eine **lobuläre Hyperplasie**. Häufig sind die Hyperplasien mit Zellatypien, also Veränderungen der Zellmorphologie oder Chromatinstruktur des Zellkerns assoziiert. Dann spricht man von einer atypischen Hyperplasie. Je nach Entstehungsort des Tumors wird zwischen einer **atypischen duktalen Hyperplasie (ADH)** und einer **atypischen lobulären Hyperplasie (ALH)** unterschieden. Frauen mit einer atypischen Hyperplasie haben ein erhöhtes Brustkrebsrisiko und sollten in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden. Eine operative Entfernung benigner Läsion erfolgt in der Regel nicht, kann aber in Ausnahmefällen durchgeführt werden, z. B. wenn eine ADH in Nachbarschaft eines duktales Carcinoma *in situ* (siehe Kapitel 1.1.2.2) auftritt bzw. bei unsicherem Stanzbiopsieergebnis, bei so genannten B3-Läsionen, das sind Läsionen mit unklarem malignem Potenzial.

#### 1.1.2.2 *In situ*-Karzinome

Die Mammakarzinome werden histologisch in zwei Gruppen eingeteilt: die nicht invasiven Tumore, zu denen die *in situ*-Karzinome gehören und die invasiven Karzinome (siehe Kapitel 1.1.2.3).

Das Carcinoma *in situ* (CIS) zählt zu den Präkanzerosen. Diese werden häufig auch als Krebsvorstufen oder Frühläsionen bezeichnet und sind Gewebeveränderungen, die zu bösartiger Entartung neigen, aber bei intakter Basalmembran noch kein invasives Wachstum zeigen und nach bisherigem Wissensstand keine Metastasen bilden. Nach der Art des Ursprungsgewebes werden ähnlich wie bei den Hyperplasien zwei Formen, das intraduktale Carcinoma *in situ* (DCIS) und das lobuläre Carcinoma *in situ* (LCIS) unterschieden. Sie sind als getrennte Entitäten zu bewerten, die sich hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens, ihrer Morphologie und Diagnostik und der daraus ergebenden Therapie deutlich voneinander abgrenzen (Silverstein, 1997). *In situ*-Karzinome werden nach der internationalen histopathologischen Klassifizierung (TNM-System, siehe Kapitel 1.1.2.3) mit pTis gekennzeichnet.

##### Duktales Carcinoma *in situ* (DCIS)

Das duktales Carcinoma *in situ* ist definiert durch die Präsenz von Tumorzellen, die vom Epithel der Drüsengänge abstammen, sich strikt innerhalb des Gangsystems akkumulieren, die Basalmembran des Kanälchens nicht durchbrechen und demzufolge auch nicht das Stroma infiltrieren. Beim DCIS sind mindestens zwei oder mehr Milchgänge mit einem minimalen Durchmesser von 2 bis 3 mm betroffen. Eine sichere Abgrenzung des DCIS von einerseits hochgradig atypischen, jedoch benignen Veränderungen des Epithels (ADH) und andererseits von der minimalen stromalen Invasion kann für den Pathologen problematisch sein. Bei zirka 70 bis 95 % der DCIS kommt es zu Mikrokalkeinlagerungen in den Zellen, wodurch sich das DCIS besonders gut in der Mammographie darstellen lässt. Allerdings kann sich bei Nichtbehandlung

des Tumors ein invasives Karzinom entwickeln. Histopathologisch wie auch nach dem klinischen und prognostischen Verhalten stellt diese Präkanzerose eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Oft zeigen DCIS eine multifokale Ausbreitung, wobei die Tumorherde meist im selben Quadranten der Brust dicht zueinander liegen. Das Auftreten getrennter Herde in mehreren Quadranten der Brust (Multizentrität) ist eher selten. Wichtige histopathologische Marker, die in enger Beziehung zu einem erhöhten Rezidivrisiko stehen, also einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose des Krankheitsverlaufs haben, sind die Größe des Tumors, ein hoher Kerngrad, das Vorhandensein von Nekrosen, ein Abstand des Tumors zum Schnitttrand  $< 10$  mm und Multizentrität. Dem Wachstumsmuster des Tumors wird bisher keine prognostische Bedeutung zugeschrieben.

Die Einteilung der DCIS erfolgt nach den Kriterien der Van-Nuys-Klassifikation nach Silverstein *et al.* (1995), basierend auf der Bestimmung des Kerngrades nach Lagios (1990). Mit der Ermittlung des Kerngrades wird der Differenzierungsgrad eines Tumors charakterisiert. Es werden drei Gruppen unter Einbeziehung der Größe der Zellkerne, deren Chromatinstruktur (diffus, grobkörnig, vaskulär) und des Auftretens von Nukleoli unterschieden. Dabei entsprechen Tumore mit Kerngrad 1 den niedrig differenzierten, Tumore mit Grad 2 den intermediär und Tumore mit Grad 3 den hochdifferenzierten DCIS.

Die Van-Nuys-Klassifikation (Van-Nuys-Prognoseindex, VNPI) dient zur Abschätzung des Rezidivrisikos bei DCIS und erleichtert die Entscheidung bei der Therapie. Es werden drei Van-Nuys-Gruppen, entsprechend dem Kerngrad und dem Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein von Nekrosen erfasst. Patientinnen der Gruppe 3 mit Nekrosen entwickeln signifikant häufiger Rezidive als die der Gruppe 1 ohne Nekrosen oder der Gruppe 2 mit Nekrosen. Neben der Van-Nuys-Gruppe werden Tumorgröße und Resektionsrand bestimmt. Aus allen drei Parametern wird ein Summenindex ermittelt, durch den das Rezidivrisiko von DCIS abgeschätzt wird und der die Wahl der Therapie erleichtert (VNPI 4-6: niedriges Rezidivrisiko, Entfernung des Tumors und ab VNPI 5 ggf. Bestrahlung; VNPI 7-9: intermediäres Risiko, Entfernung des Tumors und Bestrahlung, VNPI 10-12: hohes Risiko, Mastektomie).

Die Standardbehandlung beim DCIS ist die brusterhaltende Operation, die meist von einer zusätzlichen postoperativen Bestrahlung begleitet wird, um das Auftreten von Rezidiven zu reduzieren. Bei vorhandenen Östrogenrezeptoren kann eine zusätzliche präventive Wirkung mit dem Medikament Tamoxifen (Antiöstrogen) erzielt werden. Eine Entfernung der Lymphknoten ist bei den DCIS in der Regel nicht erforderlich und eine Entfernung der Brustdrüse (Mastektomie) wird nur bei sehr großen Tumoren von  $> 4$  bis  $5$  cm Durchmesser durchgeführt oder wenn der Tumor nach mehreren Nachresektionen nicht im Gesunden entfernt werden kann. Nach einer Mastektomie ist eine Bestrahlung oder systemische adjuvante Therapie (Chemotherapie, Antiöstrogen- oder Antikörperbehandlung) nicht erforderlich.

### Lobuläres Carcinoma *in situ* (LCIS)

Die lobulären *in situ*-Karzinome sind relativ selten und repräsentieren nur 1 bis 6 % aller Brusttumore. Histologisch betrachtet sind sie wesentlich einheitlicher als diejenigen duktales Ursprungs. Eine Unterteilung nach Kerngrad und prognostisch relevanten morphologischen Kriterien wie bei den DCIS gibt es daher nicht. Beim lobulären Carcinoma *in situ* (LCIS) kommt es zu Proliferationen innerhalb der Drüsenläppchen (Lobuli) unter Einbeziehung der intralobulären Ductili. Im Gegensatz zu den ALH, bei denen die Läppchen partiell befallen und Restlumina vorhanden sind, ist beim klassischen LCIS die gesamte terminale duktulo-lobuläre Einheit unter Erhalt der azinären Architektur betroffen. Es handelt sich um langsam proliferierende monomorphe und hoch differenzierte Zellen mit geringer Zahl an Mitosen. Das LCIS wird in der Regel als Begleitbefund festgestellt, ist meist nicht palpabel und führt nur selten zu Kalzifikationen, so dass es mammographisch schwierig nachzuweisen ist. Häufig treten multizentrische Herde in beiden Brüsten bei bis zu 69 % der Fälle auf. Patientinnen, die an einem LCIS erkranken, besitzen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines duktales Mammakarzinoms und nur ein Teil der LCIS besitzt die Potenz zur Progression in ein invasives lobuläres Karzinom (Remmele, 1997).

Anders als beim DCIS ist für die Therapie lobulärer Neoplasien der Abstand zum Resektionsrand nicht relevant und eine Mastektomie nicht indiziert. Da die LCIS wenig strahlensensibel sind, ist eine adjuvante Nachbestrahlung der Brust nicht erforderlich. Auf Grund des häufigen multizentrischen Tumorwachstums wird eine jährliche Kontrolle im Rahmen einer Mammographie empfohlen (Untch et al., (2005). Eine zu erwähnende Sonderform ist das pleomorphe LCIS, das sich durch sehr große osteoklastenartige Epithelzellen auszeichnet, zentrale Nekrosen aufweisen kann und häufig mit einem pleomorphen invasiven lobuläres Karzinom oder einem DCIS assoziiert ist. Daher werden pleomorphe Läsionen im Gegensatz zum klassischen LCIS vollständig entfernt und wie ein invasives Karzinom behandelt.

#### 1.1.2.3 Invasives Mammakarzinom

Ein invasives Karzinom liegt vor, wenn Tumorzellen die Basalmembran durchbrechen, die das Drüsenepithel vom mesenchymalen intralobulären Stroma abgrenzt. Auch die invasiven Mammakarzinome werden histogenetisch in duktales und lobuläres Karzinome untergliedert, wobei das invasiv duktales Karzinom (IDC) mit zirka 80 % der verbreitetste Tumortyp ist. Absteigend folgen das invasiv lobuläres Karzinom (ILC) mit zirka 10 % und das medulläre Karzinom mit zirka 1 bis 4 %. Am seltensten treten das tubuläre, das muzinöse und das papilläre Karzinom mit einer Häufigkeit von jeweils 1 bis 2 % auf (Lebeau et al., 2005).

### Histopathologische Klassifikation und Gradeinteilung

Die histopathologische Klassifikation des Mammakarzinoms in Stadien (englisch Staging) erfolgt nach den international vereinbarten Kriterien des pTNM-Systems der

„International Union against Cancer“ (UICC) (Sobin & Wittekind, 2002). Es sieht die postoperative (p) Beschreibung von Primärtumorgröße pT (1-4), Beurteilung regionärer Lymphknoten (pN 0-3) und eine histopathologische Identifizierung von Fernmetastasen (pM) vor. Dabei ist der axilläre Lymphknotenstatus der stärkste Prognosefaktor für ein Rezidiv und das Überleben. So wird bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen ein Zehnjahresüberleben von 86 % festgestellt, während bei Befall von zehn und mehr Lymphknoten im gleichen Zeitraum nur 27 % der Patientinnen überleben (Engel *et al.*, 2005). Bevorzugte Orte der Metastasierung sind neben den Lymphknoten vor allem das Skelett (70 %), die Lunge (60 %), die Leber (50 %), aber auch die Nebenniere, das Gehirn und die Haut (Häring & Zilch, 1997).

Die histologische Gradeinteilung (engl. Grading) nach den Vorschlägen von Bloom & Richardson (1957) und Modifikationen durch Elston & Ellis (1991) und Bässler *et al.* (1992) berücksichtigt sowohl das Wachstumsmuster des Tumors als auch seine zytologische Differenzierung. Eine Beurteilung erfolgt nach den Kriterien Tubulusausbildung und Kernpolymorphie, die sich auf die Größe und Chromatinverteilung der Kerne bezieht, sowie der Mitoserate, gemessen nach der Zahl der Mitosen pro Gesichtsfeld. Auf dieser Grundlage lassen sich alle invasiven Tumore in drei verschiedene Malignitätsgrade gruppieren. Sie werden in gut differenzierte Tumore mit unauffälligen Zellkernen und verbreiteter Tubulusausbildung (Grad 1), in mäßig differenzierte Tumore (Grad 2, Übergangsform) und in schlecht differenzierte Tumore ohne Tubuli mit hoher Mitoserate (Grad 3) zugeordnet. Diese Gradeinteilung ist, unabhängig vom TNM-Stadium, ein prognostischer Faktor und zeigt eine enge Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, der Frequenz von Rezidiven, dem Nodalstatus und der Mortalität (Remmele, 1997). In Abhängigkeit von anderen Prognosemarkern nimmt das relative Zehnjahresüberleben mit zunehmendem Grad stark ab (Grad 1: 94 %, Grad 2: 74 % und Grad 3: 55 %) (Engel *et al.*, 2005).

### Prognosefaktoren

Mit Hilfe von Prognosefaktoren versucht man, den Krankheitsverlauf von Patientinnen möglichst genau vorherzusagen, um eine auf das biologische Verhalten des Tumors abgestimmte individuelle Therapie zu ermöglichen. Die höchste klinische Relevanz besitzen die „klassischen“ Prognosefaktoren, zu denen das Ausbreitungsstadium des Tumors (pTNM-Status), sein Wachstumsmuster (histopathologischer Typ, Grading) und der Östrogen-/ Progesteron-Rezeptorstatus (ER-/ PgR) zählen.

Ist durch diese „klassischen“ Faktoren keine eindeutige Einordnung des Tumors und ausreichende Prognoseabschätzung gegeben, werden zur Absicherung häufig so genannte „neue“ Prognosemarker herangezogen. Als prognostische Parameter werden z. B. die Überexpression bzw. Genamplifikation von HER2-neu (siehe unten), die Proliferationskinetik der Epithelzellen und die DNA-Ploidie erfasst. Als Proliferationsmarker dient z. B. der Nachweis der erhöhten Expression des Ki-67 Gens, welches nur in der Teilungsphase des Zellzyklus exprimiert wird. Die DNA-Zytometrie

ermöglicht die Unterscheidung zwischen diploiden und aneuploiden Zellen. Veränderungen des DNA-Gehaltes, bedingt durch die Akkumulation genetischer Veränderungen im Genom, wurden schon sehr früh quantitativ mittels DNA-Zytometrie bestimmt und deren Korrelation zum Grading festgestellt (Auer *et al.*, 1984). Der Krankheitsverlauf verschlechtert sich mit Zunahme der Proliferationsaktivität und Aneuploidie der Tumorzellen. Ein Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark („*minimal residual disease*“) zum Zeitpunkt der Primärtherapie ist mit einem vermehrten Auftreten von Rezidiven und einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert (Pantel *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2001; Roggel *et al.*, 2003).

### Prädiktive Marker

Neben den vielen Prognosefaktoren gibt es nur wenige prädiktive Marker, die das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen und die Wahl einer individuellen Behandlung erleichtern. Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich um den Östrogen-/ Progesteron-Rezeptorstatus und den Status von *HER-2/neu*, auf die daher näher eingegangen werden soll. Bei positivem Rezeptorstatus von Östrogen (ER) und Progesteron (PgR) profitiert die Patientin von einer adjuvanten Hormontherapie. Der Nachweis zur Erfassung des ER- und PgR-Status erfolgt durch immunhistochemische Methoden unter Verwendung monoklonaler Antikörper. Patientinnen mit rezeptor positiven Tumoren haben eine Ansprechrate auf eine Hormontherapie von 60 bis 75 % und zeigen in der Regel eine höhere Überlebensrate (Jansen *et al.*, 1997). Diese Tumore zeichnen sich durch ein niedriges histologisches Grading, eine geringe Proliferationsaktivität und einen diploiden DNA-Gehalt der Zellen aus (Ross *et al.*, 2004). Eine medikamentöse Hormontherapie ist gegen das Östrogen gerichtet, das den Tumor zum Wachsen bringt. Die Wirkstoffe können z. B. GnRH-Analoga sein, die direkt auf die Hypophyse wirken und die pulsatile Ausschüttung von FSH und LH supprimieren, Aromatasehemmer, die die zelluläre Umwandlung von Androstendion zu Östrogen unterdrücken, Gestagene, die die Östrogenrezeptorsynthese hemmen oder Antiöstrogene, wie z. B. das Medikament Tamoxifen, dessen Wirkstoff kompetitiv an den Östrogenrezeptor bindet. Dadurch werden die Zellen in der frühen G1-Phase des Zellzyklus arretiert und das Zellwachstum vermindert. Bei ER/ PgR-negativen Tumoren sind hohes Grading, Kernanaplasie, Aneuploidie sowie hohe Proliferationsaktivität dominierend. Häufig sind sie mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert, einschließlich der Amplifikation von Onkogenen wie *HER-2/neu* und *MYC* sowie einer Mutation des *TP53*-Gens.

Da eine Überexpression des Onkoproteins *HER-2/neu* meist mit einem aggressiven Verlauf der Tumorerkrankung korreliert ist, spielt der *HER-2/neu*-Status eine wichtige Rolle für die Entscheidung über ein Ansprechen auf die Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Bei etwa 10 bis 34 % aller Frauen mit invasivem Brustkrebs wurde eine Überexpression dieses Proteins festgestellt, die auch mit einer Amplifikation des *HER-2/neu* Gens korreliert (Ross & Fletcher, 1999). Eine Bestimmung von *HER-2/neu* erfolgt mittels immunhistochemischer Methoden unter Verwendung von Antikörpern

und bei unklarem Befund auch auf Genebene durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH). Die Behandlung mit dem spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin) bewirkt ein Andocken des Antikörpers an die HER-2/neu-Rezeptoren und blockiert somit die Bindung von Wachstumsfaktoren, die die Krebszelle sonst zur Proliferation anregen würden. Das Medikament wird in Deutschland zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs eingesetzt.

### Diagnostik und Therapie

In der Mammographie auffällige Läsionen werden in der Regel durch eine Biopsie abgeklärt. Dabei ist die Stanzbiopsie in Deutschland die Standardmethode der präoperativen Mammadiagnostik, bei der histologisches Material in Form eines Gewebezylinders entnommen wird. In einigen Ländern wie z. B. in Schweden kann auch die Feinnadelaspiration, eine minimal invasive Punktionsmethode, bei der nur wenige Zellen mit einer dünnen Kanüle aspiriert werden, zum Einsatz kommen. Allerdings ist der Gewebeverband nach einer Feinnadelpunktion nicht mehr erhalten, was die Unterscheidung zwischen invasiven und nicht invasiven Läsionen erschweren kann. In Deutschland erfolgt die Diagnosestellung anhand einer histologischen Untersuchung unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Klassifizierung und Stadieneinteilung des exzidierten Tumors.

An Schnittpräparaten wird das Gewebe auch im Hinblick auf die Nachweisbarkeit von Hormon- und HER-2/neu Rezeptoren sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 analysiert. Wichtig ist die Untersuchung axillärer Lymphknoten, insbesondere des Wächter-Lymphknotens (*sentinel lymph node*), zur Abklärung von Infiltrationen durch tumoröses Gewebe. Unter Berücksichtigung chirurgischer Verfahrensweisen wird der Tumor entfernt und operativ histologisch abgeklärt.

Neben der chirurgischen Entfernung des Tumors können Krebszellen durch eine Bestrahlung oder die Zellgifte einer Chemotherapie abgetötet werden. Die Art der adjuvanten Therapie richtet sich hauptsächlich nach dem Tumorstadium und danach, ob bereits eine Metastasierung in andere Organe oder eine Infiltration der Lymphknoten stattgefunden hat. Die Therapie des invasiven Mammakarzinoms ist sehr komplex und wird immer mehr auf die individuelle Situation der Patientin angepasst. Weltweit werden klinische Studien mit dem Ziel durchgeführt, welche Patientengruppe von welcher Therapieform am meisten profitiert, d. h. in welcher Gruppe ein langes krankheitsfreies Überleben mit möglichst geringen Nebenwirkungen erreicht wird.

## **1.1.3 Genomische Charakterisierung des Mammakarzinoms**

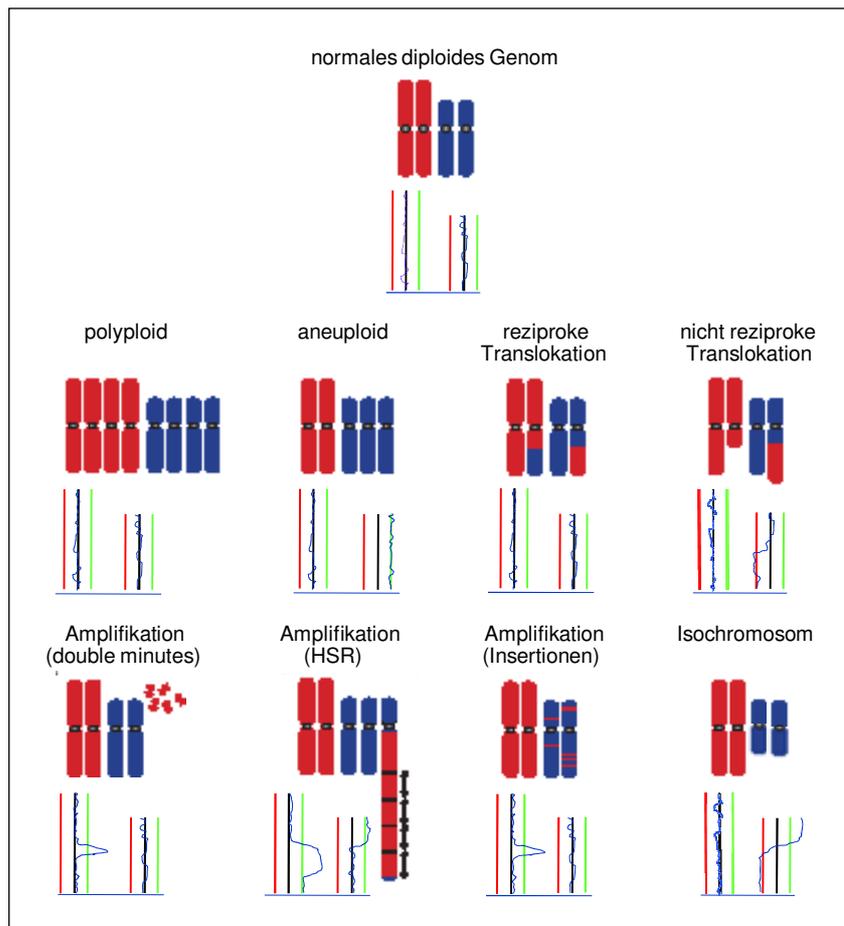
### **1.1.3.1 Entstehungsmechanismen chromosomaler Aberrationen**

Ein maligner Tumor entsteht, wenn mehrere zellregulatorische Kontrollmechanismen außer Kraft gesetzt werden. Das kann eine Folge epigenetischer Veränderungen oder somatischer Mutationen sein, die das Zellwachstum anregen oder die Stabilität des

Genoms beeinträchtigen. Bei der Entstehung von Krebs können unterschiedliche Gruppen von Genen auf verschiedene Art mutiert sein. Onkogene fördern aktiv die Zellproliferation und liegen häufig in multiplen Kopien (Amplifikationen) in einer Zelle in Form von kleinen separaten Chromosomenfragmenten (*double minutes*), Insertionen innerhalb von Chromosomen (*homogenously staining regions*, HSRs) oder über das Genom verteilt vor (siehe Abbildung 1.2). Beim Brustkrebs häufig amplifizierte Onkogene sind z. B. *HER-2/neu* (17q12) und *MYC* (8q24.21). Eine *HER-2/neu*-Amplifikation wird als frühes Ereignis bei der Brustkrebsentstehung beschrieben und korreliert mit einer schlechten Prognose beim invasiven Karzinom. Als Folge dieser Amplifikation ist das HER-2/neu-Onkoprotein, ein transmembraner Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ, meist überexprimiert. Amplifikationen von *MYC* sind mit einem aggressiven Verhalten des Tumors und mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert. Das Gen reguliert verschiedene zelluläre Funktionen wie Replikation, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Auch Tumorsuppressorgene (TS-Gene) sind direkt an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Ein Verlust von *TP53* beispielsweise bewirkt, dass geschädigte Zellen nicht in Apoptose gehen können und weiter proliferieren. Eine dritte Gruppe von Genen, die Mutatorgene, sind verantwortlich für die Wahrung der Integrität der genetischen Information (Strachan & Read, 1996). Defekte in diesen Genen führen zu Fehlern bei der Replikation oder Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die dadurch verursachte genetische Instabilität erhöht die Mutationsrate und führt zur Entstehung von z. T. komplexen chromosomalen Aberrationen wie Translokationen oder Amplifikationen (siehe Abbildung 1.2). Eine der meist verbreitetsten Veränderungen beim Brustkrebs sind beispielsweise Rearrangements von Chromosom 1. Aus zytogenetischen Untersuchungen ist bekannt, dass es häufig als Isochromosom vorliegt. In der Mitose kommt es dabei zu einer Fehlverteilung der Chromosomen, was statt zu einer Trennung in die Chromatidenpaare zu einer Segregation in Chromatidenarme führt. Somit geht die Erbinformation auf dem nicht mehr vorhandenen Arm verloren.

Häufig entstehen durch Nondisjunktion auch Aneuploidien, Duplikationen oder Deletionen einzelner ganzer Chromosomen, oder es kommt nach Verdopplung der DNA zur Polyploidisierung, indem sich die Zelle nicht teilt. Genomische Instabilität und numerische Aberrationen können auch als Folge einer fehlerhaften Verdopplung der Zentrosomen und der damit verbundenen Ausbildung multipolarer mitotischer Spindeln auftreten. Eine Instabilität der Chromosomen kann auch auftreten, wenn die Funktion der Chromosomenenden (Telomere) gestört ist. Dadurch können verschiedene Chromosomen miteinander fusionieren, es kommt vermehrt zu Chromosomenbrüchen und aberranten Zellteilungen (Albertson *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) lassen sich numerische chromosomale Veränderungen in Tumorzellen aufdecken. Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über mögliche Formen von Aberrationen und wie sie sich im CGH-Profil darstellen.



**Abbildung 1.2: Typen chromosomaler Aberrationen und ihre Detektion durch CGH**

Bei Polyploidien und reziproken Translokationen enthalten die homologen Chromosomen die identische Menge an Genmaterial. Diese können mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) nicht nachgewiesen werden. Bei allen anderen Formen an Aberrationen kommt es zu numerischen Abweichungen wie Zugewinnen oder Verlusten genetischen Materials, die durch die CGH-Methode detektiert werden können. Bei Zugewinnen ist die blaue Kurve im CGH-Profil, das unterhalb der Chromosomen dargestellt ist, nach rechts und bei Verlusten nach links verschoben. Die Abbildung wurde nach Albertson et al. (2003) modifiziert.

#### 1.1.4 Pathogenese - Stammzell-Hypothese und Multistep-Modell

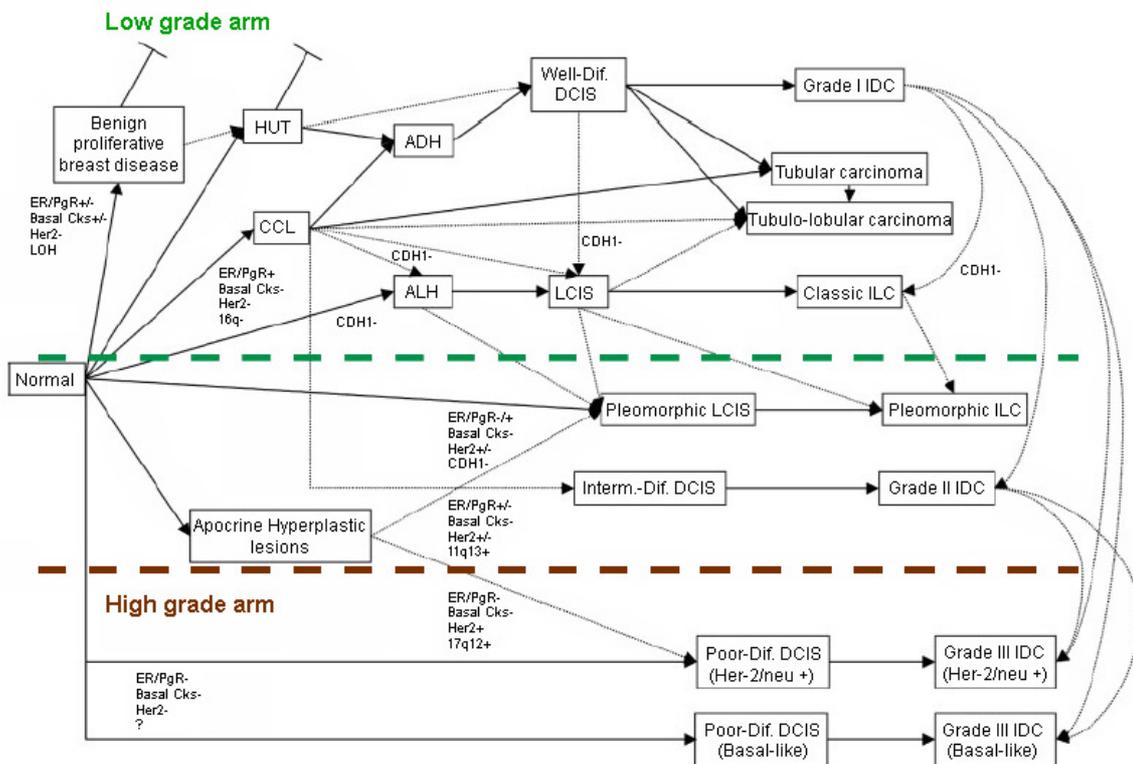
In Anlehnung an Vogelstein's Modell zur Karzinogenese des Kolonkarzinoms geht man auch beim Mammakarzinom von einem multifaktoriellen Prozess und einer schrittweisen Akkumulation genetischer Veränderungen aus (Vogelstein et al., 1988). Dabei wird eine sukzessive Tumorprogression, ausgelöst durch Mutationen, vom normalen Epithel über Hyperplasien mit und ohne Atypien zu den *in situ*-Karzinomen bis hin zum invasiven Karzinom mit Metastasen beschrieben. Seit Kurzem weiß man, dass Brusttumore aus veränderten adulten Stammzellen, so genannten Krebsstammzellen, hervorgehen können, aber nicht jede dieser Zellen in der Lage ist, einen neuen Tumor auszubilden. Im Jahre 2003 gelang es Al-Hajj und Kollegen, solche, Brustkrebs auslösenden Stammzellen anhand spezifischer Zelloberflächenmarker

(CD44+/ CD24-) aus menschlichen Brusttumoren zu identifizieren und zu isolieren und von nicht karzinogenen Zellen zu unterscheiden. Schon wenige Zellen dieses Phänotyps reichten aus, um bei immundefizienten Mäusen Tumore zu erzeugen. Man geht davon aus, dass ein Teil dieser tumorauslösenden Stammzellen das Potential zur Selbsterneuerung beibehält, während sich andere Stammzellen über einen Pool von Vorläuferzellen zu Brustkrebszellen mit hoher Proliferationsaktivität differenzieren. Aus den Vorläuferzellen hervorgegangene Zellen verlieren ihre Stammzeleigenschaften und sind dann nicht mehr in der Lage, einen neuen Tumor auszubilden.

Die Tumorentstehung und die damit verbundenen Veränderungen zellregulatorischer Mechanismen sind komplexe Prozesse, so dass die Beschreibung eines linearen Progressionsmodells anhand rein morphologischer Merkmale heute nicht mehr als ausreichend erscheint. Molekularzyogenetische Untersuchungen an invasiven Brusttumoren haben gezeigt, dass es unterschiedliche Muster genetischer Veränderungen bei verschiedenen Tumorstadien gibt und die Assoziation zum Grad der Differenzierung (Grading) von besonderer Bedeutung ist (Nishizaki *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Buerger *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2000; Gunther *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Waldman *et al.*, 2001; Thor *et al.*, 2002; Cingoz *et al.*, 2003). So wurden im Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad bei schlecht differenzierten und aneuploiden Tumoren andere und komplexere Veränderungen des Genotyps beobachtet als bei gut differenzierten Tumoren. Beispielsweise sinkt die Häufigkeit von Deletionen (Verlusten) des langen Arms von Chromosom 16 mit zunehmendem Kerngrad. Diese Deletion wurde bei 65 % der Grad 1 Tumore, bei 50 % der Grad 2- und bei 20 % der Grad 3-Karzinome detektiert. Obwohl entsprechende Mechanismen wie z. B. Nondisjunktion von Chromosom 16 denkbar sind, geht man davon aus, dass ein Zurückgewinn von frühzeitig deletiertem genetischen Material eher unwahrscheinlich ist. Eine Progression vom *low-grade*- zum *high-grade*-Karzinom scheint daher eher selten aufzutreten. Aus diesen Erkenntnissen wurde abgeleitet, dass offenbar zwei distinkte Progressionswege existieren (Roylance *et al.*, 1999; Buerger *et al.*, 2001; Reis-Filho & Lakhani, 2003). Es ist wahrscheinlich, dass sich aus gut differenzierten DCIS Grad 1 invasive duktales Karzinome Grad 1 entwickeln können. Außer der Deletion des langen Arms von Chromosom 16 zeigen die Grad-1-Läsionen nur wenige weitere genetische Aberrationen wie z. B. Zugewinne der Chromosomenarme 1q und 16p (Roylance *et al.*, 1999). Neben diesen für den „*low-grade*“-Weg charakteristischen Veränderungen existiert ein zweiter Progressionsweg, der für die „*high-grade*“-Tumore typisch ist, die meist komplexere Veränderungen des Genotyps aufweisen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. So haben Grad 3 Tumore häufig Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q, 5p, 8q und 17q und Amplifikationen auf den Chromosomenbanden 17q12, 17q22-q24, 6q22, 8q22-q24, 11q13 und 20q13. Typische Verluste treten auf den Chromosomenarmen 8p, 11q, 13q, 14q und 17p auf.

Ein erweitertes Multistep-Modell von Simpson *et al.* (2005), das ebenfalls zwischen einem „*low-grade*“- und „*high-grade*“-Weg differenziert, bezieht zusätzliche

Erkenntnisse aus Genexpressionsanalysen von Perou *et al.* (2000) mit ein (siehe Abbildung 1.3). Danach werden die Mammakarzinome zu vier prognostisch bedeutsamen Subgruppen zusammengefasst: 1) „ER+/ luminal-like“, 2) HER-2+, 3) „basal-like“ und 4) „normal breast“.



**Abbildung 1.3: Multistep-Modell der Tumorgenese unter Berücksichtigung morphologischer, immunhistochemischer und molekularer Aspekte nach Simpson *et al.* (2005)**

Ausgehend vom normalen Epithel über verschiedene Zwischenstadien bis hin zum invasiven Karzinom, sind zwei verschiedene Progressionswege für die Brustkrebsentstehung von Bedeutung. Der „low-grade arm“ umfasst beispielsweise gut differenzierte DCIS, die aus Hyperplasien hervorgehen und sich zu Grad 1 IDC entwickeln können und der „high-grade arm“ repräsentiert schlecht differenzierte DCIS, aus denen Grad 3 IDC abstammen können. Mäßig differenzierte DCIS nehmen eine Zwischenstellung ein. Sie können z. B. hormonrezeptorpositiv oder -negativ sein. Eine Entwicklung vom mäßig differenzierten DCIS zum Grad 2 IDC gilt als gesichert. Zusätzlich ist der Progressionsweg für die ILC über ALH und LCIS aufgeführt sowie die Entwicklung pleomorpher ILC und tubulärer Karzinome.

Abkürzungen: +: Zugewinn genetischen Materials bzw. positive Proteinexpression; -: Verlust genetischen Materials bzw. kein Nachweis des Proteins; ADH: Atypisch duktales Hyperplasie, ALH: Atypisch lobuläre Hyperplasie; CCL: Zylinderzellläsion (columnar cell lesion); CDH1: E-Cadherin-Gen; CKs: Zytokeratine; DCIS: Duktales carcinoma in situ; ER: Östrogenrezeptor; HUT: Hyperplasie (hyperplasia of usual type); IDC: invasives duktales Karzinom; ILC: invasives lobuläres Karzinom; LOH: Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity); PgR: Progesteronrezeptor; Poor-Dif., Interm.-Dif. und Well-Dif.: schlecht, mäßig und gut differenziertes DCIS.

Gut differenzierte Tumore mit niedrigem Kerngrad sind meist hormonrezeptor-positiv, negativ für HER-2 und basale Marker wie Zytokeratin 5 (CK 5) und haben in der Regel eine deutlich bessere Prognose als schlecht differenzierte Tumore, die rezeptor-negativ und positiv für HER-2 und basale Marker sind. Das von Simpson *et al.* (2005) neu definierte Modell verdeutlicht die Komplexität der Tumorgenese des Mammakarzinoms.

### 1.1.5 Genomische Veränderungen unterschiedlicher Tumorstadien

Zur Erfassung und Charakterisierung genomischer Veränderungen in Tumorzellen wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Dazu gehören z. B. die klassische zytogenetische Karyotypisierung von Metaphasechromosomen des Tumorgenoms, auf der *in situ*-Hybridisierung basierende Techniken, wie die konventionelle und neuerdings die Array-CGH-Methode, die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) und die Spektrale Karyotypisierung (SKY) sowie verschiedene PCR-Techniken (z. B. LOH „Loss of heterozygosity“ und MLPA „Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification“). Eine nähere Beschreibung der FISH-, und CGH-Methoden erfolgt in Abschnitt 1.2.

Besonders intensiv sind die chromosomalen Veränderungen invasiver Brusttumore untersucht worden. Auf häufige Aberrationen der „low-grade“- und „high-grade“-Tumore, einschließlich Amplifikationen, wurde oben bereits eingegangen. Diese Veränderungen sind besonders für invasiv duktales Karzinome typisch. Invasive lobuläre Karzinome weisen im Durchschnitt eine geringere Zahl an Aberrationen auf (Nishizaki *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Buerger *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2000; Gunther *et al.*, 2001; Loveday *et al.*, 2000). Charakteristisch ist der homozygote Funktionsverlust des Gens E-Cadherin (CDH1) auf dem langen Arm von Chromosom 16 auf der Bande 16q22.1, der bereits beim LCIS beobachtet wird sowie Zugewinne auf 1q (Roylance *et al.*, 2003; Cleton-Jansen *et al.*, 2004). Ansonsten können LCIS und ILC ähnliche genetische Merkmale wie Tumore des „low-grade“-Wegs zeigen.

Zu genetischen Veränderungen von Präkanzerosen und benignen Brustveränderungen gab es bis vor Kurzem nur vergleichsweise wenige Daten. CGH-Analysen von DCIS ergaben, dass deren chromosomale Veränderungen zum Teil schon denen invasiver Karzinome entsprechen (James *et al.*, 1997; Kuukasjarvi *et al.*, 1997; Aubele *et al.*, 1999). Tumorzellen von DCIS, die durch Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebeverband separiert wurden, zeigten in der CGH-Analyse Zugewinne für die Chromosomen 1q, 6p, 7q, 8q, 10q, 14q, 15q, 16, 17, 19q, 20, 21q und 22q und Verluste auf den Chromosomenarmen 4q, 9p, 11q und 13q. Dabei wurden Zugewinne der Chromosomenarme 3p und 12q mit einer höheren Frequenz in einem an das DCIS angrenzenden IDC nachgewiesen (IDC: Zugewinn von 3p in 3 von 7 Fällen und Zugewinn auf 12q in 4 von 7 Fällen; DCIS: Zugewinn für 3q und 12p jeweils in 1 von 7 Fällen) (Aubele *et al.*, 2000 a). Die LCIS zeigten wie oben erwähnt vermehrt

Zugewinne auf 1q (4 von 6 Fälle) und Verluste auf dem Chromosomenarm 16q (4 von 6 Fälle) (Buerger *et al.*, 2000).

Duktale Hyperplasien (DH) und atypische duktale Hyperplasien (ADH) wurden erstmals von Aubele und Kollegen (2000 b) mittels CGH untersucht. Bei den ADH wurden Zugewinne auf den Chromosomenarmen 3p, 8q, 15q und 22q und Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 16 identifiziert. Bereits bei einfachen DH fand man Amplifikationen auf dem langen Arm von Chromosom 20, was auf ein eher frühes Ereignis im Verlauf der Tumorprogression hindeutet. Allelische Imbalancen mittels LOH-Analyse wurden bei den ADH auf den Armen 16q und 17p und bei Hyperplasien auf 16p, 16q und 17q detektiert (Lakhani *et al.*, 1995; Lakhani *et al.*, 1996).

Bei benignen Brustveränderungen werden gelegentlich kleinere nicht gehäuft auftretende Veränderungen einzelner Loci beobachtet, jedoch gibt es kaum Übereinstimmungen zu den verbreitetsten Alterationen bei den DCIS (Boecker *et al.*, 2001; Reis-Filho & Lakhani, 2003). An normalen Brustepithelzellen wurden bisher keine größeren chromosomalen Veränderungen beobachtet, außer wenn die Zellen unmittelbar an einen Tumor angrenzten.

## **1.2 Methoden zur genomischen Charakterisierung des Mammakarzinoms**

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

Die *in situ*-Hybridisierung hat sich als wichtige molekularzytogenetische Methode zur Aufdeckung numerischer und komplexer Chromosomenaberrationen in der Tumorzytogenetik und genetischen Diagnostik etabliert (Pardue & Gall, 1969; Langer *et al.*, 1981; Cremer *et al.*, 1986; Pinkel *et al.*, 1986). Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) werden markierte einzelsträngige DNA-Sequenzen z. B. auf Metapasechromosomen oder auf Interphasekerne (Interphasezytogenetik) von zytologischen Präparaten oder Gewebeschnitten hybridisiert. Als FISH-Sonden dienen z. B. lokusspezifische DNA-Klone (BACs, YACs, PACs), zentromer-, telomer- oder chromosomenspezifische Sonden. Eine besondere Form der FISH ist die CGH-Methode, bei der als Sonde markierte genomische DNA eingesetzt wird (siehe Abschnitt 1.2.2). FISH-Sonden können indirekt mit einem Hapten (z. B. mit Biotin-dUTP) oder direkt durch an ein Fluorochrom gekoppeltes Nukleotid (z. B. Cyanin-3-dUTP) mittels verschiedener Techniken wie Nick Translation, Markierungs-PCR, Random Priming markiert werden. Um verschiedene DNA-Sequenzen in einem Experiment gleichzeitig darzustellen, werden häufig differenziell markierte Sonden eingesetzt, wobei Fluorochrome im grünen und roten Wellenlängenbereich bevorzugt werden.

Vor einer Hybridisierung müssen die Target-DNA und die Sonden-DNA zunächst einzelsträngig vorliegen, also denaturiert werden. Während der Hybridisierung binden die markierten DNA-Sequenzen an ihre passenden Bindungsstellen auf dem Hybridisierungstarget, so dass sich zwei komplementäre einzelsträngige DNA-Sequenzen zu einem Doppelstrang (Hybrid) aneinander lagern. Gleichzeitig werden repetitive DNA-Sequenzen (z. B. Alu-Sequenzen), die zirka 50 % des humanen Genoms umfassen, in einem „*Preannealing-Schritt*“ durch C<sub>0</sub>t-1 DNA unterdrückt (Pinkel *et al.*, 1988). Damit wird verhindert, dass repetitive Sequenzen der Sonde mit ähnlichen Sequenzen der Target-DNA hybridisieren und einen unspezifischen Hintergrund bilden, der das eigentliche Hybridisierungssignal überdeckt. Zur Visualisierung werden unter Einsatz entsprechender Filterkombinationen am Fluoreszenzmikroskop separate Bilder der unterschiedlich markierten Sonden mit einer CCD- (Charge-coupled device)-Kamera aufgenommen. Aus den Graustufenbildern von den Emissionen der einzelnen Fluoreszenzfarben werden durch Software Falschfarbenbilder erzeugt. Durch Übereinanderlegen der Einzelbilder wird die Auswertung, z. B. das Auszählen von drei verschieden markierten FISH-Sonden in Interphasekernen, erleichtert.

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten FISH-basierten molekularzytogenetischen Techniken zusammengestellt.

**Tabelle 1.1: FISH-basierte molekularzytogenetische Techniken in dieser Arbeit**

Methoden	Sonde	Hybridisierungsziel	Detektion
FISH	CEP*	Metaphasen und Interphasekerne	Identifikation von Chromosomen und deren Anzahl von Kopien
	BACs	Metaphasen und Interphasekerne	Mikrodeletionen und -duplikationen, Genamplifikationen (z. B. von Onkogenen)
CGH	genomische DNA	normale Metaphasen	chromosomale Imbalancen (Duplikationen, Amplifikationen, Deletionen), Auflösung > 10 Mb
Array-CGH	genomische DNA	~6.000 definierte DNA-Klone (BACs) auf einem Mikroarray	chromosomale Imbalancen (Duplikationen, Amplifikationen, Deletionen), Auflösung 0,5 bis 1 Mb

\*CEP: kommerzielle Zentromersonde (CEP, centromere enumeration probe)

### 1.2.2 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) ist eine auf der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung basierende molekularzytogenetische Methode zum Screening des gesamten Testgenoms (z. B. Tumor-DNA) im Vergleich zu einem normalen Referenzgenom innerhalb eines

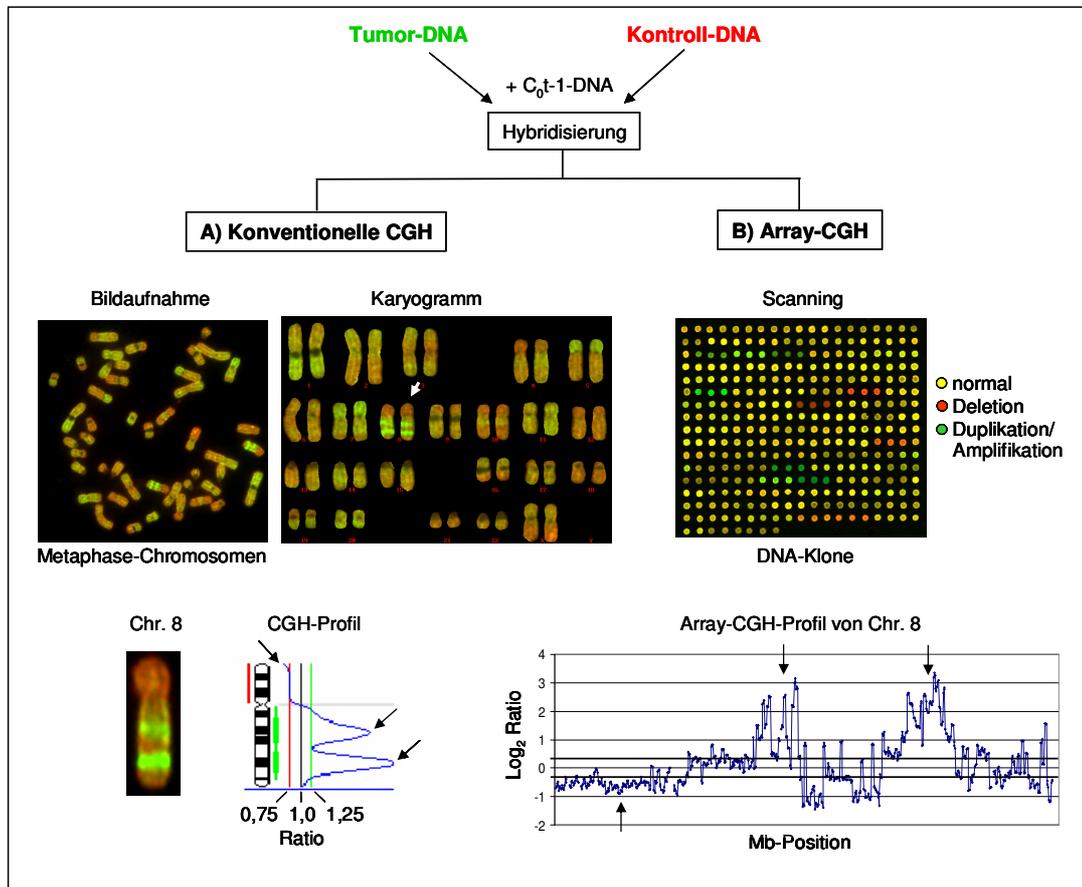
Hybridisierungsexperimentes. Dabei werden Test- und Referenz-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und bei der konventionellen CGH-Technik zusammen auf normale Metaphasechromosomen bzw. bei der Array-CGH-Methode auf einen DNA-Chip hybridisiert (Kallioniemi *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993). Die Methode umfasst neben einem Zwei-Farben-FISH-Experiment auch digitale Bildaufnahme und mathematische Analyse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (siehe Abbildung 1.4).

Ein großer Vorteil dieser Technik liegt darin, dass keine Zellkultur oder Chromosomenpräparation des zu untersuchenden Tumorgewebes erforderlich ist. Dadurch besteht die Möglichkeit, neben frischem Tumormaterial auch retrospektive Untersuchungen an archiviertem Tumorgewebe aus dem Paraffinblock durchzuführen. Mit der CGH-Technik lassen sich Amplifikationen, Deletionen und Ploidiegrade einzelner Chromosomenabschnitte detektieren. Strukturelle Aberrationen wie balancierte Translokationen und Invasionen oder eine Polyploidisierung des gesamten Genoms können allerdings nicht erkannt werden (siehe Abbildung 1.2).

#### 1.2.2.1 Konventionelle CGH-Technik

Bei der konventionellen CGH-Analyse werden Tumor-DNA z. B. mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff und Kontroll-DNA aus normalen Lymphozyten mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert und gleichzeitig auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert (siehe Abbildung 1.4; A). Repetitive Sequenzen werden durch Zugabe von humaner C<sub>0</sub>t-1 DNA in einem „*Preannealing*-Schritt“ (siehe Kapitel 1.2.1) supprimiert. Nach dem CGH-Experiment erfolgt die Bildaufnahme mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung verschiedener Bandpass-Filter für DAPI, FITC und TRITC. Mit Hilfe einer speziellen Software (z. B. Leica CW4000) werden 6 bis 10 Metaphasen karyotypisiert und analysiert. Die Chromosomen werden automatisch segmentiert und anschließend werden die Fluoreszenzintensitäten normalisiert, indem die medianen Verhältnisse der Metaphase ausgeglichen und ein Verhältnis von 1 erreicht wird. Nach lokaler Hintergrundkorrektur über die gesamte Metaphase werden die Intensitätsverhältnisse beider Fluoreszenzen über die Pixelwerte der einzelnen Segmente senkrecht zur Chromosomenachse gemittelt. Aus den Verhältniswerten der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- bzw. Kontroll-DNA entlang der medianen Chromosomenachse wird ein CGH-Profil erstellt (Piper *et al.*, 1995). Aus den CGH-Profilen lassen sich genomweit Zugewinne und Verluste der Tumor-DNA nachweisen. Bei einem ausgeglichenen Intensitätsverhältnis liegt eine gleiche Kopienzahl von Tumor- und Referenz-DNA vor. Diese Chromosomenbereiche stellen sich im überlagerten Bild in einer gelben Mischfarbe dar. Chromosomale Regionen mit einem Zugewinn, also mit Duplikation oder Amplifikation, zeigen eine erhöhte Fluoreszenz des Testgenoms, nämlich eine grüne Mischfarbe und Regionen mit einer Deletion eine verminderte Fluoreszenzintensität mit roter Mischfarbe. Die Auflösungsgrenze der konventionellen Metaphasen-CGH bei Zugewinn oder Verlust einer Kopie liegt bei etwa 10 Mb, was ungefähr einer chromosomalen Bande entspricht (Petersen *et al.*, 1996). In

Abhängigkeit von der Kopienzahl kann in amplifizierten Regionen bei einem Dosisverhältnis von mindestens 3:1 eine höhere Auflösung von zirka 2 Mb erreicht werden (Piper *et al.*, 1995). Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen lassen sich mit der konventionellen CGH nicht detektieren.



**Abbildung 1.4: Prinzip der konventionellen CGH und Array-CGH-Methode am Beispiel der Brustkrebszelllinie SKBR3**

Die Tumor-DNA wurde mit einem grünem und die Kontroll-DNA mit einem rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Beide wurden zusammen unter Suppressionsbedingungen mit humaner  $C_{0t-1}$ -DNA (hoch-repetitive DNA) (A) auf normale Metaphasechromosomen und (B) auf einen Array aus kartierten BACs hybridisiert. Beide Methoden erfassen mit verschiedener Auflösung Unterschiede in der Kopienzahl zwischen dem Tumor- und Kontrollgenom. Dies wurde durch Über- oder Unterrepräsentation der grünen Fluoreszenz auf den betroffenen Chromosomenabschnitten bzw. Spots auf dem DNA-Chip angezeigt. Deletionen sind als rotes und Zugewinne sowie Amplifikationen als grünes Fluoreszenzsignal zu erkennen. Balancierte Bereiche ohne Veränderungen der Kopienzahl erscheinen gelb. Für Chromosom 8 (Pfeil im Karyogramm) wurde eine Deletion des gesamten kurzen Arms und auf dem langen Arm zwei Amplifikationen detektiert. Dies wurde im CGH-Profil durch Über- oder Unterschreiten der Schwellenwerte (schwarze Pfeile) deutlich (Grenzwert für Verluste: Ratio  $< 0,75$ ;  $\text{Log}_2$ -Ratio  $< -0,3$ ; Grenzwert für Zugewinne: Ratio  $> 1,25$ ;  $\text{Log}_2$ -Ratio  $> 0,3$ ; normal: Ratio =  $1,0$ ;  $\text{Log}_2$ -Ratio =  $0$ ).

### 1.2.2.2 Array-CGH-Methode

Aus der konventionellen CGH-Methode wurde Ende der 1990-er Jahre von Solinas-Toldo *et al.* (1997) die Array-CGH Methode entwickelt (siehe Abbildung 1.4, B), bei der anstatt von gespreiteten Metaphasechromosomen sogenannte Mikroarrays oder DNA-Chips mit BACs, cDNAs oder Oligonukleotiden als Hybridisierungstarget benutzt werden. Im Vergleich zur chromosomalen CGH bietet diese Technik eine wesentlich höhere Auflösung und bessere Möglichkeiten zur Automatisierung. So können bisher nicht detektierbare Zugewinne kurzer Sequenzbereiche und Mikrodeletionen erfasst werden, die eine Identifizierung einzelner Gene ermöglichen, deren Kopienzahländerung mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert ist. Albertson und Kollegen (2000) ist es mit dieser Methode erstmalig gelungen, die Struktur des Amplikons in der Region 20q bei Brustkrebs aufzudecken. Die Autoren fanden zwei distinkte Amplifikationspeaks und konnten die Kandidaten-Onkogene *CYP24* und *ZNF217* in der Region 20q13.2 identifizieren. Der erste BAC-Array, der das gesamte humane Genom mit einer Auflösung von etwa 1,4 Mb abdeckt, wurde von Snijders *et al.* (2001) entwickelt und umfasst 2.460 verschiedene BACs in Triplikaten, also zirka 7.400 DNA-Fragmente, die in kleinsten Tropfen (*Spots*) auf einen beschichteten Objektträger (Chip oder Array) aufgebracht wurden. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Array mit zirka 6.000 BACs in Triplikaten mit einer genomweiten Auflösung von 0,5 bis 1 Mb verwendet, der ebenfalls das gesamte Genom abdeckt. Das Auflösungsvermögen eines Chips wird durch die Länge der DNA-Fragmente auf dem Array und dem Abstand zwischen den Sonden im Genom bestimmt. Mittlerweile gibt es hochauflösende Chips, die das Genom im kb-Bereich abdecken.

Zur Analyse der Daten werden die Fluoreszenzsignale eines gesamten Chips mit einem konfokalen Laserscanner im Cy3- und Cy5-Kanal bei einer Anregungswellenlänge von 532 bzw. 630 nm eingelesen. Das überlagerte Bild dient als Grundlage für die Auswertung. Jene wiederum umfasst die Selektion der auswertbaren *Spots* und die Berechnung der Fluoreszenzintensitäten und des lokalen Hintergrundes für jeden Spot. Zur weiteren Verarbeitung der Rohdaten einschließlich der Visualisierung der Zugewinne und Verluste im CGH-Profil stehen eine Vielzahl von Software-Tools zur Verfügung z. B. *CGHPRO* (Chen *et al.*, 2005), *arrayCGHbase* (Menten *et al.*, 2005), *CGH-Miner* (Wang *et al.*, 2005) oder *CAPweb* (Liva *et al.*, 2006). Während der Bildanalyse wird der lokale Hintergrund subtrahiert und die Daten normalisiert. Viele Programme basieren auf der LOWESS-Normalisierung (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*), die sich besonders gut zur lokalen Korrektur intensitätsabhängiger Fehler eignet. Für jedes DNA-Fragment auf dem Chip wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Test (Tumor)- und Referenz-DNA in Log<sub>2</sub>-Werte transformiert (Y-Achse) und entsprechend seiner Zugehörigkeit zu einem Chromosom (X-Achse) graphisch dargestellt. Mit Hilfe von Konfidenzintervallen werden Deletionen, Duplikationen und Amplifikationen ermittelt.

### 1.3 Zielstellung

Eine genauere Charakterisierung genetischer Veränderungen von Präkanzerosen kann zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Mammakarzinoms, insbesondere des Progressionsverhaltens beitragen und ermöglicht eventuell die Wahl einer auf die Patientin abgestimmten effektiven bzw. schonenden Therapie.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Genom solcher Vorläuferläsionen wie z. B. dem duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) und dem lobulären Carcinoma *in situ* (LCIS) sowie atypisch duktalem Hyperplasien (ADH) mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) auf genetische Veränderungen (Zugewinne und Verluste genetischen Materials) hin zu untersuchen, die erhobenen klinischen, histologischen, immunhistochemischen und DNA-zytometrischen Daten zu bewerten und miteinander in Beziehung zu setzen und zu vergleichen. Durch ergänzende Analysen von invasiven Karzinomen sollten Aberrationen bestimmt werden, die mit einem hohen Malignitätspotential und einer schlechten Prognose assoziiert sind.

Da für diese retrospektiven Untersuchungen kein frisches Gewebe zur Verfügung stand, wurde auf formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe mit verminderter Qualität zurückgegriffen. Es sollte untersucht werden, ob diese Vorgehensweise für die Routine praktikabel ist. Um aus den meist sehr kleinen Läsionen Tumorzellpopulationen mit minimalem Anteil von normalen Zellen isolieren zu können, war es erforderlich, die Tumoreareale durch lasergestützte Mikrodissektion zu separieren und die gewonnene genomische DNA zu amplifizieren und zu markieren. Dazu wurden unterschiedliche PCR-Methoden angewandt und verglichen.

Mit Hilfe der in jüngerer Zeit etablierten hochauflösenden Array-CGH-Methode sollten genetisch veränderte Regionen noch exakter eingegrenzt und nach kleinen, bisher nicht detektierbaren Veränderungen im Genom gesucht werden, um mögliche tumorassoziierte numerische Genveränderungen besser identifizieren zu können.

Basierend auf den CGH-Ergebnissen und anhand von Daten aus der Literatur sollten unter Berücksichtigung der distinkten morphologischen und genetischen Subgruppen lokusspezifische DNA-Sonden für molekularzytogenetische Untersuchungen an zytologischen und histologischen Präparaten identifiziert und generiert werden, die an ausgewählten Beispielen angewendet werden sollen. Es wurde die Voraussetzung geschaffen, die Sonden nach klinischer Evaluierung als Ergänzung zur histopathologischen Diagnostik einzusetzen.

Darüber hinaus ergaben sich weitere, detailliertere Fragestellungen:

#### **Fragen zur Methodik:**

1. Welche Methoden zur DNA-Amplifikation und DNA-Markierung sind speziell für laser-mikrodissezierte Zellen aus formalinfixiertem Gewebe, das in

Paraffinblöcken aufbewahrt wird (Archivmaterial), für die konventionelle CGH-Analyse optimal geeignet?

2. Kann diese fixierte DNA nach genomischer Amplifikation auch mit Hilfe der hochauflösenden Array-CGH-Technik untersucht werden und lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse auf die neuere Chip-Technologie übertragen?

### **Fragen zu den untersuchten Tumorproben:**

1. Welche chromosomalen Veränderungen treten in ADH, *in situ*-Karzinomen (DCIS und LCIS), invasiv duktalem und invasiv lobulärem Karzinom (IDC und ILC) auf und wie häufig sind diese?
2. Welche genetischen Aberrationen treten bei DCIS mit unterschiedlichem Kerngrad auf?
3. Wie hoch ist die Übereinstimmung genetischer Aberrationen von mehreren Tumorproben des gleichen OP-Materials einer Patientin?
4. Gibt es genetische Veränderungen in histologisch als normal klassifizierten Epithelzellen, die sich in der Umgebung des Tumors befinden?
5. Können die Tumorproben anhand der durch CGH-Analyse ermittelten Zugewinne und Verluste chromosomalen Materials zu Gruppen zusammengefasst werden? Welche gruppenspezifischen Aberrationen gibt es und sind diese prognostisch relevant?
6. Wie lassen sich die analysierten Tumorstadien hinsichtlich immunhistochemischer am Gewebeschnitt bestimmter Prognosemarker (Expression von ER, PgR, HER-2/neu und Ki-67) charakterisieren?
7. Wie groß ist die Übereinstimmung von Ergebnissen der immunhistochemisch bestimmten Überexpression von HER-2/neu und der mittels konventioneller CGH-Technik ermittelten Amplifikation des Onkogens *Her-2/neu*?
8. Welchen Zusammenhang gibt es zwischen diploiden und aneuploiden Tumoren hinsichtlich der Anzahl chromosomaler Aberrationen und der Expression von ER, PgR, HER-2/neu und Ki-67?
9. Wie unterscheiden sich die Aberrationsfrequenzen von diploiden und aneuploiden DCIS?
10. Welche Unterschiede gibt es zwischen den Ergebnissen aus Array-CGH- und konventioneller CGH-Technik und können mit Hilfe der hochauflösenden Array-CGH-Methode potentielle Onkogen-Kandidaten in amplifizierten chromosomalen Regionen ermittelt werden?
11. Wie könnte ein aus lokusspezifischen FISH-Sonden bestehendes Set zum Nachweis von Brustkrebs aussehen und wie hoch ist dessen Sensitivität innerhalb der verschiedenen Tumorstadien? Wie gut stimmen die Ergebnisse aus Interphase-FISH- und konventionellen CGH-Analysen in den ausgewählten chromosomalen Regionen miteinander überein?
12. Welche Möglichkeiten der Anwendung gibt es für ein solches Set und wo sind dessen Grenzen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenmaterial

Es wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Brustgewebe (FFPE) von 61 Patientinnen der Jahre 1996 bis 2004 untersucht, das aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Dresden und aus dem Labor für Molekularpathologie in Kiel entstammt (siehe Kapitel 1.4). Ein Ethik-Votum zur Durchführung der Analysen wurde durch die Ethikkommission des Virchow Klinikums der Charité in Berlin im März 2002 erteilt.

In Tabelle 2.1 ist die Anzahl analysierter Patientinnen für jede Tumorgruppe zusammengefasst. Von einigen Patientinnen lagen autologe Gewebeproben, eingebettet in zwei separaten Paraffinblöcken vor, die getrennt analysiert wurden. Die duktales Carcinoma *in situ* wurden nach ihrem Kerngrad in Grad 1, 2 und 3 unterteilt. Alle Proben wurden mittels CGH-Technik, Immunhistochemie und in ausgewählten Fällen auch durch DNA-Zytometrie untersucht. Eine zusammenfassende Aufstellung histopathologischer und klinischer Daten wie z. B. Alter der Patientin, Tumortyp, Tumorgroße, Grading, Vorhandensein von Nekrosen und Auftreten eines Rezidives befindet sich im Anhang 9.2. Jede Patientenprobe ist durch eine Patienten-ID unter Berücksichtigung des analysierten Paraffinblocks (Block 1 oder 2) und des Tumortyps (z. B. 73-2-LCIS) verschlüsselt.

**Tabelle 2.1: Übersicht zu den mittels CGH, Immunhistochemie und z. T. durch DNA-Zytometrie analysierten Tumortypen und deren jeweilige Anzahl**

	DCIS gesamt	DCIS Grad 1	DCIS Grad 2	DCIS Grad 3	LCIS	ADH	IDC	ILC
Anzahl der Patientinnen	23	4	9	10	15	10	7	6
Anzahl der Proben	29	6	9	14	19	11	7	6

*DCIS: Duktales carcinoma in situ, LCIS: Lobuläres carcinoma in situ, ADH: Atypisch duktales Hyperplasie, IDC: invasives duktales Karzinom, ILC: invasives lobuläres Karzinom.*

Für die CGH-Analyse früher Brustkrebsstadien wurde das Tumorgewebe durch Laser-Mikrodissektion isoliert und die daraus gewonnene genomische DNA durch Ligations-PCR vervielfältigt (siehe Kapitel 2.4 und Kapitel 2.5). Das zur Kontrolle der CGH-Hybridisierungen zusätzlich untersuchte normale Epithelgewebe von 12 Patientinnen (insgesamt 13 Proben) wurde angrenzend zur Tumorregion ebenfalls durch Laser-Mikrodissektion gewonnen und anschließend im gleichen Ansatz mit den

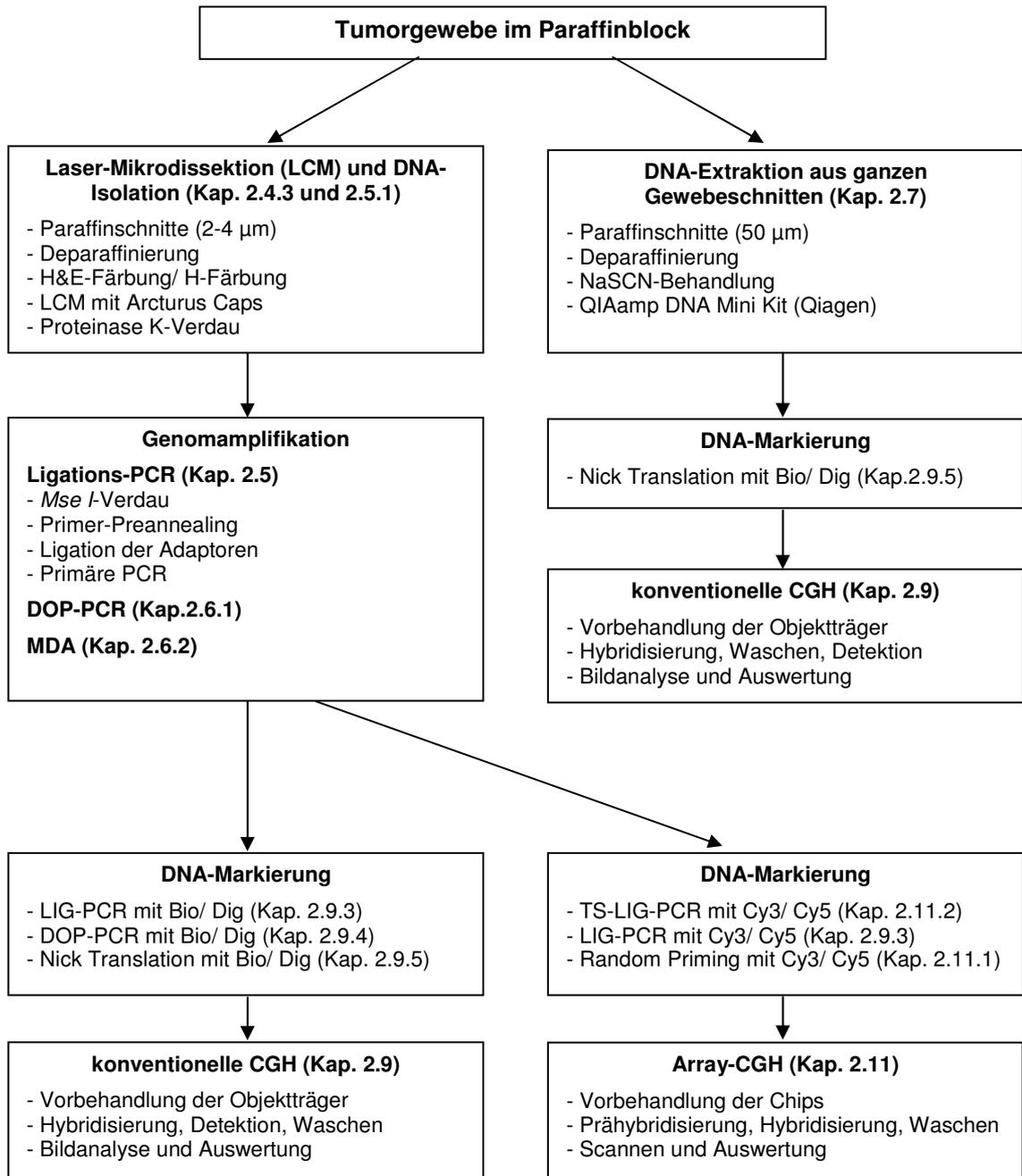
Tumorproben amplifiziert. Zur Untersuchung invasiver Karzinome wurde die DNA meist direkt aus ganzen Gewebeschnitten ohne Genomamplifikation extrahiert (siehe Kapitel 2.7) mit Ausnahme von drei Patientinnen mit einem IDC (Probe 57, 64 und 131), bei denen das Gewebe laser-mikrodisseziert wurde. Einen Überblick über die einzelnen Teilschritte gibt das Flussdiagramm in Abbildung 2.1.

Für die Interphase-FISH-Analysen wurden zytologische Präparate aus frischem OP-Material, darunter Imprints und Zytospinpräparate einer simulierten Feinnadelaspiration sowie Schnitte von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe verwendet (siehe Tabelle 2.2). Nähere Informationen zu den Patientinnen mit fibrozystischer Mastopathie liegen nicht vor.

**Tabelle 2.2: Übersicht zu den mittels Interphase-FISH analysierten Patientenproben**

	<b>normales Brustepithel</b>	<b>Fibrozystische Mastopathie</b>	<b>DCIS</b>	<b>IDC</b>	<b>ILC</b>
Anzahl der Patientinnen	1	4	2	4	1
Präparat	Schnitt	Imprint	Schnitt, Imprint* und FNA*	Imprint	Imprint

*\*Das Imprintpräparat und das Feinnadelaspirat (FNA) entstammen demselben OP-Material.*



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte zur Durchführung von CGH-Experimenten an formalinfixiertem Gewebe**

## 2.2 Immunhistochemie

### 2.2.1 Herstellung der Präparate und immunhistochemische Färbung

Von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden 4 µm dicke Serienschnitte zum immunhistochemischen Nachweis von Ki-67, ER, PgR und HER-2/neu sowie zwei H&E-Referenzschnitte (erster und letzter Schnitt) angefertigt. Für die Validierung der immunhistochemischen Färbeergebnisse wurde in jedem Durchlauf eine bekannte Positiv- und Negativkontrolle für den zu testenden Antikörper mitgeführt. Die Paraffinschnitte wurden auf spezielle Objektträger mit Abstandshaltern aufgezogen und zur besseren Fixierung auf dem Glasträger über Nacht bei 38 °C inkubiert. Danach wurden die Präparate für 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Zur Epitopendemaskierung wurden die Gewebeschnitte für 20 min in Citratpuffer (pH = 6,0) (zur Bestimmung von Her-2/neu) bzw. 45 min (zur Analyse von Ki-67) in der Mikrowelle gekocht. Für die ER und PgR-Präparate wurde ein stark alkalischer Puffer (pH = 9,9) verwendet. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und bis zum Beladen des Färbeautomaten in Tris-Puffer aufbewahrt.

Der Immunostainer wurde mit den im Kit vorgegebenen Reagenzien und dem gewünschten Antikörper bestückt. Eine Übersicht zu den verwendeten Antikörpern, Klonen und der eingesetzten Detektionsmethode ist in Tabelle 2.3 dargestellt. Die Objektträger wurden paarweise aneinander und aufrecht in die Halter des Gerätes gestellt (Kapillarspaltprinzip). Während des Färbelaufs (Programm für APAAP oder LSAB) wurden die Präparate nacheinander in die verschiedenen Reagenzien getaucht. Vor Inkubation in einer neuen Lösung erfolgte die Entleerung der Kapillarspalten durch Aufsetzen der Objektträger auf Saugkissen (Pads). Als Nachweissysteme wurden die Detektions-Kits ChemMate™ APAAP, Mouse und für LSAB ChemMate™, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Fa. Dako) eingesetzt. Im Immunostainer erfolgte schrittweise die Bindung der Antikörper an die antigenen Bindungsstellen auf den deparaffinierten Gewebeschnitten. Im Anschluss wurde die Farbreaktion zur Visualisierung entweder durch Substrat-Chromogenlösung (APAAP-Methode) oder 3'-Diaminobenzidin (DAB) und Chromogen (LSAB-Methode) durchgeführt. Im letzten Inkubationsschritt wurden die Präparate durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau eingefärbt. Nach Beendigung des Programms wurden die Präparatepaare aus dem Färbeautomaten entnommen und vorsichtig von einander gelöst. Anschließend erfolgte das Eindecken der Präparate nach einer aufsteigenden Ethanolserie und Xylol mit Mountex.

**Tabelle 2.3: Dako-Antikörper und Markierungsmethoden**

APAAP (*alkalische Phosphatase und anti-alkalische Phosphatase*), LSAB (*Labelled Streptavidin-Biotin*)

Mammakarzinom-assoziierte Antikörper		Klon	Verdünnung	Methode
Maus Anti-Human	ER	1D5	1:50	APAAP
Maus Anti-Human	PgR	PgR 636	1:50	APAAP
Maus Anti-Human	Ki-67-Antigen	MIB-1	1:100	APAAP
Kaninchen Anti-Human	HER-2/neu	polyklonal	1:100	LSAB

### 2.2.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion erfolgte unter einem Lichtmikroskop mit einem 10x- und 40x-Objektiv. Eine Auswertung der Präparate war nur dann möglich, wenn bei der positiven Kontrollprobe eine spezifische positive Färbung an der erwarteten Position des Zielantigens vorlag, unspezifische Farbreaktionen deutlich von der spezifischen Färbung unterschieden werden konnten und wenn in der Negativkontrolle keine Farbreaktion zu sehen war.

Bei einer positiven Reaktion wurden die Zellkerne für Ki-67, ER und PgR rot (APAAP) und die Zellmembranen für HER-2/neu braun (LSAB) angefärbt. Von etwa 2000 Zellen verschiedener Tumoreareale pro Schnitt wurden die positiv gefärbten Zellen ausgezählt und die Intensität der Kernfärbung bewertet. Die Expression der nachgewiesenen Epitope für ER und PgR wurde nach dem Immunreaktiven Score (IRS) in Tabelle 2.4 evaluiert.

**Tabelle 2.4: Ermittlung des Immunreaktiven Score (IRS)**

Das Produkt aus den Faktoren Kernanfärbbarkeit (a) und der Menge an positiv gefärbten Zellen (b) ergibt den IRS (c) (Remmele & Stegner, 1987).

Anfärbbarkeit der Kerne	a) Faktor	Menge der positiven Zellen [%]	b) Faktor	c) IRS
negativ	0	< 10 %	1	0 rezeptornegativ
schwach	1	10-50 %	2	1-4 rezeptorarm
mittelstark	2	50-80 %	3	5-8 mäßig rezeptorreich
stark	3	> 80 %	4	9-12 rezeptorreich

Für die Bestimmung der Überexpression des HER-2/neu-Proteins wurde die Intensität der braunen Membranfärbung nach der für den Hercep-Test (Fa. Dako) üblichen Bewertung charakterisiert (siehe Tabelle 2.5). Als HER-2/neu positiv wurden Tumore mit einem Score-Wert von 2+ und 3+ eingestuft.

**Tabelle 2.5: HER-2/neu Score**

Score	Bewertung der HER-2/neu Expression	Intensität und Art der Färbung
0	negativ	keine oder schwache Membranfärbung bei < 10 % der Tumorzellen
1+	negativ	schwache Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen. Nur Teile der Membran sind angefärbt.
2+	positiv	mittelstarke Färbung der kompletten Membran in > 10 % der Tumorzellen
3+	positiv	starke komplette Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen

## 2.3 DNA-Zytometrie

### 2.3.1 Feulgen-Färbung

Imprintpräparate von IDC und ILC und deparaffinierte Gewebeschnitte von DCIS wurden in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert und für 60 min in 5M HCl-Lösung bei 22 °C hydrolysiert (Saure Hydrolyse). Durch weitere 90-minütige Inkubation der Präparate in Schiff'schem Reagenz im Dunkeln, bei Raumtemperatur wurde ein roter Farbkomplex gebildet, der die DNA spezifisch anfärbte (Feulgen & Rosenbeck, 1924). Anschließend wurden die Präparate für 3 x 10 min in frisch angesetzter Natriumdisulfit-Lösung (10 ml 10 %-iges  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 10 ml 1M HCl, 180 ml destilliertes Wasser) gewaschen. Zum Schluss wurden die Präparate in Leitungswasser gespült, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, in Xylol überführt und in Mountex eingedeckt.

### 2.3.2 DNA-Messung und Histogramm-Auswertung

Die quantitative Analyse des DNA-Gehaltes einzelner Zellen (Zellkerne) wurde an den Feulgen-gefärbten Präparaten bei 546 nm (grüner Spektralbereich) im Durchlicht unter Verwendung eines Mikroskops (Axioskop, Zeiss) mit einem planen Objektiv (40/ 0,95; Immersion, Nikon) und einer CCD-Kamera (Sony) durchgeführt. Das Mikroskop war an ein computergestütztes Bild-Analyse-System (Ahrens ICM Zytometrie-System, Bargtheide) gekoppelt. Vor der eigentlichen Messung wurde für jedes Präparat als interner Standard der DNA-Mittelwert aus zirka 30 diploiden Referenzzellen, meist

Lymphozyten des gleichen Präparates, zur Definition des 2c-Referenzwertes (diploid) verwendet, auf den die DNA-Messwerte der Tumorzellen bezogen wurden. Die per Mausclick selektierten normalen Zellen bildeten einen relativ schmalen Peak, der nach der 2c-Normierung automatisch auf den Sollwert 2c festgelegt wurde. Der 2c-Referenzwert musste für jedes Präparat neu bestimmt werden. Für die folgende Analyse wurden zirka 200 Tumorzellen der relevanten Tumorregion gemessen. Überlappende oder bei Gewebeschnitten durch das Mikrotom sichtbar angeschnittene Kerne wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Durch DNA-Histogramme werden diploide oder nahezu diploide (1,5c bis 2,5c), tetraploide (3,5c bis 4,5c) und aneuploide (> 4,5c) Tumorzellpopulationen klassifiziert. Die 2,5c-ER (Exceeding-Rate) definiert den Prozentsatz der Zellen, deren DNA-Gehalt oberhalb der diploiden Region liegt, Zellen oberhalb der 5c-Schwelle werden durch die 5c-ER beschrieben. Aus den gewonnenen DNA-Histogrammen lässt sich neben dem Ploidiestatus der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellpopulationen einer Probe im Zellzyklus ablesen.

## **2.4 Laser-Mikrodissektion von Tumorzellen**

Die lasergestützte Mikrodissektion ermöglichte eine exakte Isolation der gewünschten Tumorareale aus einem heterogenen Gewebeverband. Histologische Schnitte wurden auf Folien-Objektträger aufgebracht, mit Eosin Y gefärbt und die Tumorregionen durch einen erfahrenen Pathologen markiert. Die mittels Laser automatisch ausgeschnittenen Tumorareale standen anschließend für die nächsten Schritte der Analyse, der DNA-Extraktion und DNA-Amplifikation (siehe Kapitel 2.5) zur Verfügung.

### **2.4.1 Vorbereitung von Folien-Objektträgern**

In Vorbereitung der Mikrodissektion wurden die mit 2 µm dicker Mikrodissezierfolie beschichteten Objektträger angefertigt. Dazu wurde die Folie in zirka 4,5 x 2,2 cm große Stücke geschnitten, auf herkömmliche Glasobjektträger mit Mattrand gelegt und glatt gestrichen, damit der Schnitt später plan aufliegen kann. Rechts und links wurde die Folie über die gesamte Breite auf dem Objektträger mit Fixogum fixiert. Die Folien-Objektträger wurden getrocknet und unter UV-Licht sterilisiert.

### **2.4.2 Herstellung von Paraffinschnitten und Färbung**

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Referenzschnitte (H&E-Schnitte) dienen zur Beurteilung des Gewebes und zum Einzeichnen der Tumorregionen durch einen Pathologen und erleichterten so die Orientierung bei der Mikrodissektion.

Mit einem Mikrotom wurden vier serielle Schnitte pro Paraffinblock angefertigt. Der erste und letzte Schnitt hatten eine Dicke von 2 µm. Diese wurden auf Superfrost plus Objektträger aufgezogen und dienten als Referenz. Die Schnitte 2 und 3 waren 4 µm dick. Sie wurden auf Folien-Objektträger aufgebracht, für 2 h auf eine 58 °C warme

Heizplatte gelegt und anschließend über Nacht in einer leeren Glasküvette bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden sie für 15 min (3 x 5 min) in 100 % Xylol deparaffinisiert. Nach einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 80 %, 70 % und A. dest) erfolgte die Kernfärbung mit 0,1 % Mayer's Hämatoxylinlösung (Sigma) für 2 min. Anschließend wurden alle Schnitte für 2 min in Leitungswasser gebläut. Die Referenzschnitte wurden zusätzlich mit 0,1 % Eosin Y (Sigma) gefärbt. Schnitte für die Mikrodissektion wurden nur mit Hämatoxylin gefärbt, um störende Effekte in der nachfolgenden PCR-Reaktion zu vermeiden. In einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden alle Schnitte dehydriert und nur die H&E-Schnitte in Eukitt eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die mit Hämatoxylin gefärbten Schnitte zur Mikrodissektion wurden etwa 20 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Folie mit dem Gewebe vom Objektträger entfernt, gewendet und auf einem neuen Objektträger fixiert, so dass das Gewebe unter der Membran lag und vor Kontamination geschützt wurde.

### 2.4.3 Laser-Mikrodissektion

Zur Durchführung der Mikrodissektion wurde das PALM Mikrobeam-System (P.A.L.M. Microlaser Technologies) oder eine Workstation der Firma Molecular Machines & Industries benutzt. Unter Verwendung der als Schablone dienenden Referenzschnitte mit dem markierten Tumorareal wurde auf das zu dissezierende Gebiet ein mit einer adhären Folie beschichtetes Cap (Fa. Arcturus) aufgesetzt. Anschließend wurden die histologisch relevanten Areale softwaregesteuert isoliert. Dabei wurde auf dem Bildschirm des Rechners zunächst mit Hilfe der Maus eine Markierung um die Gewebeareale gezeichnet, entlang dieser später laser-mikrodisseziert wurde. Durch vorsichtiges Abheben des Caps blieben die Tumorareale an der Folie des Caps haften, die dann in einem PCR-Reaktionsgefäß aufbewahrt wurden. Pro Schnitt wurden etwa 600.000  $\mu\text{m}^2$  (zirka 1.000 Zellen) separiert.

## 2.5 Genomamplifikation mit Ligations-PCR

Die genomische DNA wurde aus den Tumorzellen durch einen Verdau mit Proteinase K aufgeschlossen und das gesamte Genom durch Ligations-PCR (*ligation-mediated* PCR, LIG-PCR) in mehreren Teilschritten nach Klein *et al.*, (1999) und Stoecklein *et al.*, (2002) amplifiziert. Das Protokoll wurde speziell zur Genomamplifikation von Einzelzellen entwickelt und eignet sich ebenfalls für laser-mikrodissezierte Zellen aus formalinfixiertem Gewebe und Proben mit limitierter Ausgangs-DNA.

Für die CGH-Analyse war es wichtig, dass die weibliche Referenz-DNA aus Lymphozyten in gleicher Weise wie die Tumor-DNA amplifiziert wurde, um Hybridisierungsartefakte auf Grund nicht repräsentativer Amplifikationen zu vermeiden. Diese Kontroll-DNA konnte ohne Proteinase K-Verdau direkt mit dem Enzym *Mse I* fragmentiert und nach Ligation der Adaptoren durch Ligations-PCR amplifiziert werden (siehe Kapitel 2.5.2 bis 2.5.5).

### 2.5.1 Proteinase K-Verdau

Mit Hilfe des Proteinase K-Verdau wurde die genomische DNA aus den Tumorzellen aufgeschlossen. Dazu wurde das laser-mikrodissezierte Gewebeareal einschließlich der Folie vorsichtig mit einer sterilen Pinzette vom Cap entfernt und in ein 500 µl Eppendorfgefäß mit 4,5 µl Proteinase K-Mix (0,5 µl OPA-Puffer, 0,13 µl 10 %-iges Tween 20, 0,13 µl 10 %-iges Igepal, 0,26 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 3,48 µl H<sub>2</sub>O) überführt. Wegen des geringen Volumens wurde die Folie mit dem mikrodissezierten Gewebe mit einer sterilen Kanüle in die Proteinase K-Lösung eingetaucht. Die Polyestermembran des Caps verblieb im Reaktionsgefäß und beeinflusste die weiteren Reaktionsabläufe nicht. In der PCR-Maschine wurden die Proben für 15 h bei 42 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 10 min bei 80 °C inaktiviert.

### 2.5.2 *Mse* I-Verdau

Ziel des *Mse* I-Verdau war es, 365 bp große DNA-Fragmente mit einem TA-Überhang zu erzeugen (Schnittstelle T' TAA), an die die Adaptoren später ligiert werden konnten (siehe Kapitel 2.5.4). Dazu wurde ein Mix aus 0,25 µl *Mse* I Enzym (50 U/µl) und 0,25 µl H<sub>2</sub>O hergestellt und zur DNA-Probe hinzu pipettiert. Die Fragmentierung der DNA erfolgte in einer 3-stündigen Reaktion bei 37 °C mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C in 5 min.

### 2.5.3 Primer-Preannealing

Die Primer CAB-21 (Sequenz: 5'-CTG TGT CTG ACG ACT CAG TCT-3') und ddCAB-12 (Sequenz: 5'-TAA GAC TGA GTCdd-3') wurden so ausgewählt, dass während der Annealingreaktion eine komplementäre Basenpaarung zwischen den Oligonukleotiden zu so genannten Adaptoren erfolgt und TA-Überhänge am 5'-Ende entstehen (Christoph Klein, persönliche Mitteilung). Der kürzere der beiden Primer ist am 3'-Ende dideoxymodifiziert (dd), so dass dort keine weiteren Bindungen möglich sind.

Zur Herstellung der Adaptoren (Annealing der Primer) wurden 0,5 µl OPA-Puffer, jeweils 0,5 µl der Primer CAB-21 und ddCAB-12 sowie 2,0 µl H<sub>2</sub>O in einem neuen Reaktionsgefäß vorgelegt. Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min von 65 °C auf 15 °C abgekühlt.

### 2.5.4 Ligation der Adaptoren

Die Ligation der Adaptoren mit den DNA-Fragmenten (siehe Kapitel 2.5.2 und Kapitel 2.5.3) erfolgte durch Zugabe von je 1 µl ATP (10 mM) und 0,5 µl T4 DNA-Ligase (10U/µl) bei 15 °C über Nacht. Dabei geht der längere CAB-21 Primer eine kovalente Bindung mit einem DNA-Fragment ein, während der kürzere Primer ddCAB-12 nur über Wasserstoffbrücken binden kann, weil ihm das für die Ligation notwendige 5'-Phosphat fehlt.

### 2.5.5 Primäre PCR

Nachdem die Adaptoren an die DNA-Fragmente ligiert waren, wurde zu der Probe folgender PCR-Ansatz gegeben: 3 µl Puffer 1 (*Expand Long Template*), 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl Polymerase Mix 5U/µl (*Expand Long Template*) und 35 µl Aqua dest. In einer der eigentlichen PCR vorgeschalteten „Auffüllreaktion“ wurde der kürzere Primer durch Inkubation bei 68 °C für 3 min entfernt und die 3'-Enden komplementär zum langen CAB-21 Primer wieder aufgefüllt. Für die „Auffüllreaktion“ und Amplifikation der genomischen DNA wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	68 °C	3 min	Auffüllreaktion
2	94 °C	40 s	15 Zyklen
3	57 °C	30 s	
4	68 °C	1 min 30 s + 1 s/ Zyklus	
5	94 °C	40 s	9 Zyklen
6	57 °C +1 °C/ Zyklus	30 s	
7	68 °C	1 min 45 s + 1 s/ Zyklus	
8	94 °C	40 s	23 Zyklen
9	65 °C	30 s	
10	68 °C	1 min 53 s + 1 s/ Zyklus	
11	68 °C	3 min 40 s	
12	4 °C	∞	Ende

Ein Teil des PCR-Produkts konnte nun in einer Markierungs-PCR mit Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt und auf Metaphasechromosomen oder DNA-Chips hybridisiert werden.

## 2.6 Weitere Methoden zur Amplifikation genomischer DNA

Zur Vervielfältigung genomischer DNA wurden neben der Ligations-PCR-Methode die DOP-PCR- und die MDA-Amplifikation-Methode verglichen.

### 2.6.1 DOP-PCR

Mittels DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*), Telenius *et al.* (1992) wurde unfixierte genomische DNA bzw. isolierte DNA aus Paraffinmaterial amplifiziert. Für alle PCR-Reaktionen wurde der universelle 6-MW-Primer (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') mit einer degenerierten Region aus sechs zufällig gewählten Nukleotiden (N = A, T, C oder G) in der Mitte verwendet. Dieser Bereich wurde am 5'-Ende von Sequenzen aus zehn Nukleotiden und am 3'-Ende von sechs spezifischen Basen flankiert. Unter niedriger *Annealing*-Temperatur bei 30 °C während der ersten acht PCR-Zyklen binden die Primer alle 300 bis 3.000 bp unspezifisch, dafür aber an vielen Stellen im Genom. Bei stringenteren Bedingungen während der nächsten 35

Zyklen wurden die voramplifizierten Sequenzen spezifisch angereichert. In dieser Phase binden die Primer in ihrer vollen Länge.

Für die DOP-PCR wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz 200 ng genomische DNA, 10 µl 5x PCR-Puffer D (Invitrogen), 1 µl DOP-Primer (100 µM), 4 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl Super *Taq*-Polymerase (15 U/µl) eingesetzt. Es wurde folgendes Temperatur- und Zeitprogramm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	96 °C	3 min	
2	94 °C	1 min	8 Zyklen
3	30 °C	1,5 min	
4	72 °C	2 min	
5	94 °C	1 min	35 Zyklen
6	56 °C	1 min	
7	72 °C	2 min	
8	72 °C	5 min	
9	4 °C	∞	Ende

Die aus der Amplifikation resultierenden Produkte erreichten Fragmentlängen von 200 bp bis 2 kb. Für die CGH-Analyse wurde nur ein Teil der amplifizierten genomischen DNA eingesetzt. Fluoreszenzfarbstoffe wurden entweder mittels Nick Translation (siehe Kapitel 2.9.5) oder durch DOP-PCR (siehe Kapitel 2.9.4) in die DNA eingebaut und der gesamte markierte Ansatz in einem CGH-Experiment verwendet.

## 2.6.2 « Multiple Strand Displacement Amplification » und DNA-Markierung

Die Methode der „*Multiple Strand Displacement Amplification*“ (MDA) basiert auf dem Prinzip, dass komplementäre DNA-Stränge durch immer wieder neue Stränge ersetzt werden (*multiple displacement*). Die Amplifikationsreaktion wird durch eine DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi 29 katalysiert, die eine 3'- zu 5'-Exonukleaseaktivität zur Korrektur fehlerhafter Nukleotidinkorporationen besitzt. Diese Methode eignet sich zur Vervielfältigung von mindestens 1 ng genomischer DNA und wurde daher ebenfalls auf eine mögliche Anwendung für extrahierte DNA aus laser-mikrodisseziertem Gewebe getestet. Als Kontrolle diente männliche und weibliche DNA aus Lymphozyten.

Alle für die Amplifikation notwendigen Reagenzien waren Bestandteil des Kits „*GenopmiPhi DNA Amplification*“ (Fa. Amersham Biosciences). Es wurden 100 ng genomische DNA in einem auf 1 µl eingengtem Volumen mit 9 µl Proben-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 0,5 mM EDTA und Zufallshexamerprimer) gemischt und 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Bindung der Zufallsprimer an die einzelsträngige DNA erfolgte durch Abkühlung der Probe auf 4 °C. Danach wurden 9 µl Reaktionspuffer, bestehend aus Nukleotid-Mix, und 1 µl Enzym Mix zur gekühlten Probe pipettiert. Während einer 18-stündigen Inkubation bei 30 °C katalysierte die DNA-Polymerase die

Amplifikationsreaktion. Die Reaktion wurde bei 65 °C, 10 min durch Inaktivierung des Enzyms beendet.

Zur Markierung der mittels MDA amplifizierten DNA wurden drei verschiedene Testexperimente durchgeführt:

- 1) Das gesamte Produkt (zirka 2 µg DNA) wurde durch Nick Translation mit Biotin bzw. Digoxigenin markiert (siehe Kapitel 2.9.5).
- 2) Es wurde geprüft, ob eine simultane Markierung während der Amplifikationsreaktion möglich ist. Dazu wurden dem jeweiligen Reaktionspuffer und dem Enzym-Mix (siehe oben) entweder 0,5 µl Biotin-dUTP oder Digoxigenin-dUTP hinzugefügt.
- 3) Weil die Zusammensetzung der Puffer und die Konzentration der Nukleotide des Kits unbekannt waren, wurde zusätzlich ein selbst hergestellter Reaktionspuffer und Nukleotid-Mix in Anlehnung an Lizardi *et al.*, (1998) und Zhong *et al.*, (2001) getestet. Dazu wurden der denaturierten Probe (siehe oben) 0,5 µl Reaktionspuffer (500 mM Tris, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mg/ml BSA), 0,5 µl Biotin-dUTP oder Digoxigenin-dUTP, 1 µl Nukleotid-Mix (jeweils 2 mM A, G, C und 1,5 mM T), 2,5 µl Hexamerprimer (0,2 µg/µl, Fermentas GmbH), 0,5 µl H<sub>2</sub>O und 0,2 µl Enzym (Kit) hinzugegeben. Nach der oben beschriebenen Inkubation und Enzyminaktivierung wurde die markierte DNA vor der Hybridisierung durch einen DNase-Verdau auf eine Länge von 600 bp eingestellt.

## 2.7 DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten

Die DNA-Extraktion aus mehreren 50 µm dicken Paraffinschnitten erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Tissue Protocol, Fa. Qiagen). Da es sich hier um formalinfixiertes Gewebe handelte, waren einige Modifikationen erforderlich. Erstens wurden mehrere 50 µm dicke Schnitte aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe in einem Reaktionsgefäß in 100 % Xylol bei 55 °C für 15 min deparaffiniert, zwei Mal mit 100 % Isopropanol und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und das Gewebe bei 55 °C im Thermomixer getrocknet. Im zweiten Schritt wurde das Pellet in 1 ml 1 M NaSCN resuspendiert. Das Natriumthiocyanat diente dazu, intramolekulare Vernetzungen, die bei der Formalinfixierung entstehen, zu lösen und dadurch das Gewebe besser aufzuschließen. Nach Inkubation der Probe bei 37 °C über Nacht und anschließender Zentrifugation wurde das Natriumthiocyanat im Überstand verworfen. Im dritten Schritt wurde der Proteinase K-Verdau durchgeführt. Dazu wurde das vorbehandelte Gewebe in 200 µl ATL-Puffer aufgenommen und durch mehrfaches Zugeben von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 55 °C über Nacht verdaut. Die weitere Inkubation der Probe in AL-Puffer und die Elution der DNA über eine Säule erfolgten entsprechend dem Firmenprotokoll.

## 2.8 DNA-Extraktion aus Lymphozyten und der Zelllinie SKBR3

Die zur Durchführung der CGH-Analyse benötigte Kontroll-DNA wurde aus weiblichen bzw. männlichen Lymphozytenkulturen isoliert. Für eine Positivkontrolle wurde DNA der Tumorzelllinie SKBR3 (ATCC-Nr. HTB-30, USA) eingesetzt.

Zu 10 ml EDTA-Blut wurden 30 ml Lysis-Puffer (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) dazugegeben. Unter vorsichtigem Schwenken entstand nach etwa 10 min eine klare Lösung, die für 10 min bei 4 °C und 1.200 rpm zentrifugiert wurde. Nach Entfernen der lysierten Erythrozyten im Überstand wurden die sedimentierten Leukozyten in 10 ml Lysis-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und zentrifugiert. Eine Wiederholung dieses Schrittes diente dazu, Verunreinigungen durch verbliebendes Hämoglobin zu entfernen. Zum Proteinase-K-Verdau wurden 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml), 70  $\mu\text{l}$  RNase (10 mg/ml) und 250  $\mu\text{l}$  20 % SDS mit dem Pellet gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abbau der Proteine wurden 5 ml SE-Puffer dazugegeben. Die DNA-Reinigung von Proteinfragmenten erfolgte in drei Schritten durch Zugabe von 10 ml Phenol, 10 ml Phenol/ Chlorophorm (1:1) und 10 ml Chlorophorm/ Isoamylalkohol (24:1). Zwischen den einzelnen Schritten wurde die wässrige von der organischen Phase durch Zentrifugation bei 3.000 rpm über 5 min getrennt und jeweils weitergeführt. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 300  $\mu\text{l}$  3 M NaAC und 10 ml Isopropanol zur Ausfällung gebracht, in 70 %-igem Ethanol gewaschen und danach in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

## 2.9 Konventionelle CGH-Analyse

### 2.9.1 Chromosomenpräparation für FISH-Experimente

Für alle CGH-Experimente und zur Überprüfung der Lokalisation von FISH-Sonden wurden Objektträger mit Metaphasechromosomen benötigt. Die Chromosomenpräparate wurden aus Lymphozyten von gesunden weiblichen und männlichen Probanden hergestellt.

Dazu wurden 10 ml heparinisieretes Blut bei 1.000 rpm für 10 min zentrifugiert, 2 ml Serum einschließlich der Lymphozytenschicht entnommen und in 50 ml Medium (RPMI-Medium 1640) mit L-Glutamin, ergänzt mit 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin, 120  $\mu\text{g}$  Phytohämagglutinin und durch Hitze inaktiviertes 20 %-iges fetales Kälberserum suspendiert. Die Suspension wurde für 72 h in einem mit 5 %  $\text{CO}_2$  begasten Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Colcemid (10  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde die Lymphozytenkultur auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Während der weiteren Inkubation für 20 min wurden die Zellen im Metaphasestadium arretiert. Nach der darauf folgenden Zentrifugation bei 1.200 rpm für 12 min wurde das Medium bis auf 5 ml über dem Zellpellet entfernt und resuspendiert. Anschließend wurde zur hypotonischen Behandlung der Zellen schrittweise 37 °C warme 0,4 %-ige KCl-Lösung

hinzugegeben, gemischt und die Suspension auf ein Gesamtvolumen von jeweils 40 ml gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min.

Nach erneutem Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurde in jedes Röhrchen zunächst 2 ml frisch hergestelltes eiskaltes Fixativ (Verhältnis Methanol : Eisessig; 3 Teile + 1 Teil) pipettiert, sofort resuspendiert und das Volumen auf 25 ml ergänzt. Nach Zentrifugation folgten in gleicher Weise zwei weitere Waschschriffe mit Fixativ. Die Zellsuspensionen wurden in 15 ml Röhrchen mit Spitzboden überführt und die Waschschriffe mit frischem Fixativ so lange fortgesetzt, bis alle Reste lysierter Erythrozyten entfernt waren. Das Zellpellet wurde in 4 bis 6 ml Fixativ resuspendiert, bevor die Suspension auf gereinigte Objektträger über einem warmen Wasserbad in feuchter Atmosphäre aus etwa 50 cm Abstand aufgetropft wurde. Da dieser Schritt kritisch war, wurde die Qualität der Metaphasepräparate (Anzahl und Spreitung der Metaphasen und Menge an Zytoplasma um die Zellen) unter dem Mikroskop überprüft. Die Präparate wurden nach dem Trocknen an der Luft in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) dehydriert. Nach Lagerung für 3 bis 4 Tage im Brutschrank bei 37 °C konnten die Objektträger direkt zum Hybridisieren verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt werden.

### **2.9.2 Vorbehandlung und Denaturierung der Metaphasenpräparate**

Vor jeder Hybridisierung (CGH und FISH) war eine Behandlung der Metaphasepräparate erforderlich, um Zytoplasmareste zu entfernen und somit den möglichen Hintergrund zu reduzieren und um die Chromosomen für die Sonden zugänglich zu machen. Insbesondere der Pepsinverdau und die Denaturierung der Chromosomen waren kritische Schriffe, da sie einen großen Einfluss auf den Erfolg der Hybridisierung haben.

Vor der Vorbehandlung wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop geeignete Hybridisierungsareale mit einer ausreichenden Anzahl qualitativ guter Metaphasen ausgewählt und gekennzeichnet. Die Chromosomenpräparate wurden zunächst mit RNase A-Lösung (0,1 mg/ml in 2 x SSC) für 45 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend für 15 min (3 x 5 min) in 2 x SSC gewaschen. Danach wurden die Präparate in 100 ml vorgewärmter 0,01 M HCl-Lösung (pH 2,0) mit 5 µl Pepsin (100 mg/ml) in einer Glasküvette für 3 bis 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Pepsinverdau wurden die Objektträger kurz in 1x PBS getaucht und unter Nutzung des Phasenkontrastmikroskops wurde sorgfältig geprüft, ob das Zytoplasma um die Chromosomen ausreichend entfernt wurde. Die Chromosomen sollten unter dem Phasenkontrastmikroskop grau erscheinen und nicht mehr leuchten. Gegebenenfalls wurde der Pepsinverdau fortgesetzt. Nach diesem kritischen Schritt wurden die Präparate für 10 min in 1x PBS und danach für 5 min in 1x PBS/MgCl<sub>2</sub> gewaschen und in 1 % Formaldehyd/ 1x PBS/MgCl<sub>2</sub>-Lösung für 10 min fixiert. Danach wurden die Objektträger nochmals für 5 min in 1x PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) dehydriert und luftgetrocknet.

Zum Denaturieren wurden die Objektträger mit 120 µl Denaturierungslösung (70 % Formamid, 2x SSC, pH 7,0) eingedeckt und auf einer auf 74 °C vorgewärmten Heizplatte für 90 s erhitzt. Anschließend wurden die Präparate sofort in eiskaltes 70 %-iges Ethanol überführt und die Dehydrierung in 90- und 100 %-igem Alkohol bei Raumtemperatur fortgesetzt. Nach dem Trocknen der Metaphasepräparate und der Vorbereitung der DNA-Sonden (siehe Kapitel 2.9.3, 2.9.4 oder Kapitel 2.9.5) konnte die Hybridisierung (siehe Kapitel 2.9.7) erfolgen.

### 2.9.3 DNA-Markierung durch Ligations-PCR

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Markierung nach Klein *et al.*, (1999) und Stoecklein *et al.*, (2002) dienten die durch Ligations-PCR präamplifizierten DNA-Proben (siehe Kapitel 2.5).

Für die konventionelle CGH-Analyse wurde die Tumor-DNA indirekt mit Digoxigenin-dUTP und die weibliche Kontroll-DNA mit Biotin-dUTP, umgekehrt zu der sonst für die CGH üblichen Markierung markiert (*dye switch*), um mögliche Artefakte im CGH-Profil zu vermeiden (Christoph Klein, persönliche Mitteilung). Der PCR-Ansatz enthielt 1 µl des primären PCR-Produktes, 4 µl Puffer 1 (*Expand Long Template*), 8 µl CAB-21-Primer, 1,5 µl 7/8 dNTP-Mix, 1,75 µl Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP, 0,75 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und 39 µl H<sub>2</sub>O. Die PCR wurde mit dem nachfolgenden Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	94 °C	1 min	1 Zyklus
2	60 °C	30 s	
3	72 °C	2 min	
4	94 °C	30 s	10 Zyklen
5	60 °C	30 s	
6	72 °C	20 s	
7	94 °C	30 s	1 Zyklus
8	60 °C	20 s	
9	72 °C	2 min	
10	4 °C	∞	Ende

Nach der PCR wurde das gesamte Produkt einer markierten Tumor- und Referenz-DNA für ein CGH-Hybridisierungsexperiment in die DNA-Fällungsreaktion eingesetzt (siehe Kapitel 2.9.6)

### 2.9.4 DNA-Markierung durch DOP-PCR

In einem weiteren Schritt ging es darum, die durch DOP-PCR präamplifizierte DNA (siehe Kapitel 2.6.1) in einer weiteren DOP-PCR-Reaktion mit indirekten Molekülen zu markieren. Bei der Strangverlängerung werden statt dTTPs an Biotin-dUTP (Tumor-DNA) bzw. an Digoxigenin-dUTP (Kontroll-DNA) gekoppelte Moleküle eingebaut. Um

den enzymatischen Ablauf aufrecht erhalten zu können, müssen auch nicht markierte dTTPs angeboten werden.

In die Reaktion wurden 1 µl der primär amplifizierten DNA, 10 µl 5x PCR-Puffer D (Invitrogen), 2,5 µl dNTPs (je 2 mM ACG), 4 µl dTTP (1 mM), 1 µl Biotin- bzw. Digoxigenin-dUTP, 1 µl DOP-Primer (100 µM) und 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) eingesetzt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl gebracht.

Die Markierungs-PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	94 °C	3 min	
2	94 °C	1 min	20 Zyklen
3	56 °C	1 min	
4	72 °C	30 s	
6	72 °C	5 min	
7	4 °C	∞	Ende

### 2.9.5 DNA-Markierung durch Nick Translation

Die Nick Translation nach Rigby *et al.*, (1977) wurde bei ausreichender Menge an Ausgangs-DNA (im µg-Bereich) zur Markierung von genomischer DNA für die CGH-Analyse, insbesondere nach DNA-Extraktion von Tumor-DNA aus ganzen Paraffinschnitten (siehe Kapitel 2.7) und zur Markierung von BAC-Sonden für die Interphase-FISH (siehe Kapitel 2.12) verwendet.

Während der Nick Translation wurde die genomische DNA zunächst mit DNase I verdaut, so dass nur einer der beiden DNA-Stränge unter Beibehaltung der Doppelstrangstruktur geschnitten wurde. Im nächsten Schritt bindet DNA-Polymerase I an diese geöffneten Phosphodiesterbindungen (Nicks) und baut auf Grund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität einen Strang der Doppelhelix ab. Gleichzeitig synthetisiert das Enzym in Gegenwart eines Gemisches aus allen vier Nukleotiden (dNTPs), von denen eines markiert ist, komplementär zum Einzelstrang einen neuen Schwesterstrang und füllt so die Lücken wieder auf. Als Ergebnis wird ein alter Strang durch einen neuen mit der gewünschten Markierung ersetzt. Die Konzentration der eingesetzten DNase I und die Dauer der Inkubation bestimmen maßgeblich die Länge der DNA-Fragmente, die Einbauraten der markierten Nukleotide und somit den Erfolg einer Hybridisierung.

Bei CGH-Experimenten wurden die Tumor-DNA mit Biotin-dUTP und die Kontroll-DNA mit Digoxigenin-dUTP in zwei separaten Ansätzen indirekt markiert. Für einen 100 µl Reaktionsansatz wurden auf Eis folgende Reagenzien pipettiert: 2 µg genomische DNA, 10 µl NT-Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 50 mM MgCl<sub>2</sub> mit 0,5 mg/ml BSA), 10 µl dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP und 0,1 mM dTTP), 10 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol, 4 µl Markierungs-dUTP (1 mM Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP), 12 µl DNase I (1:500 verdünnt) von einer 1 mg/ml Stammlösung, 2 µl DNA-Polymerase I (5 U/µl). Das Volumen wurde mit sterilem

Wasser auf 100 µl ergänzt. Der Ansatz wurde bei 15 °C für 90 min inkubiert und danach die Fragmentlänge der DNA durch Gelelektrophorese überprüft. Bei optimaler Größe der Fragmente von zirka 600 bp wurde die Enzymreaktion durch Inkubation bei 65 °C für 10 min beendet.

### 2.9.6 Fällung und Denaturierung der Sonden

Nach separater Markierung von Tumor- und Kontroll-DNA wie z. B. durch Markierungs-Ligations-PCR oder Nick Translation wurden die beiden Produkte vereinigt und unter Zugabe von 50 µl C<sub>0</sub>t-1 DNA, 1 µl Lachssperma-DNA, 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und dem 2,5- bis 3-fachen Volumen eiskaltem 100 %-igem Ethanol bei -20 °C über Nacht (oder bei -80 °C für 30 min) präzipitiert.

Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und für weitere 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 3 bis 5 min vollständig getrocknet. Das Pellet wurde in 12 µl Hybridisierungsmix für mindestens eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln gelöst und die Sonde für 10 min bei 80 °C im Wasserbad denaturiert. Die Probe wurde für eine Stunde bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, um ein ausreichendes Blockieren repetitiver Sequenzen durch die C<sub>0</sub>t-1 DNA (*Pre-annealing*-Schritt) zu ermöglichen.

### 2.9.7 Hybridisierung und Detektion

Nach separater Denaturierung der vorbehandelten Chromosomenpräparate (siehe Kapitel 2.9.2) und der markierten DNA-Sonden (Mix aus unterschiedlich markierter genomischer DNA von Tumor und Kontrolle) wurde die Sonde auf das vorgesehene Areal auf den Objektträger pipettiert und mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Mit Fixogum wurden die Ränder des Deckglases abgedichtet. Nach Trocknen des Klebers erfolgte die Hybridisierung für 48 h bei 37 °C in einer leicht angefeuchteten Kammer.

Nach der Hybridisierung wurde das Fixogum mit den Deckgläsern entfernt und die Präparate für 3 x 5 min in FA/SSC (50 % Formamid in 2 x SSC) bei 45 °C gewaschen. Bei Verwendung von direkt markierten Sonden wie Cy3 und Cy5 wurden die Präparate im zweiten Waschschrift bei 45 °C mit 1x SSC für 3 x 5 min unter weniger stringenten Bedingungen behandelt, da die Signalintensitäten im Vergleich zur indirekten Markierung wesentlich geringer waren und kaum Hintergrundfluoreszenz auftrat. Das Blockieren und die Detektion mit Antikörpern entfielen. Für indirekt mit Biotin- und Digoxigenin-dUTP markierte Sonden folgten nach dem ersten Schritt drei weitere Waschschriffe mit hoher Stringenz bei 0,1 x SSC für je 5 min bei 60 °C. Danach wurden die Präparate kurz in 4 x SSC/0,1 % Tween 20 getaucht, mit 120 µl Blockierungslösung (3 % BSA in 4 x SSC/0,1 % Tween 20) eingedeckt und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Mit diesem Schritt konnte ein unspezifisches Binden der Antikörper verhindert werden. Nach dem Blockieren wurden die

Objektträger nochmals kurz in 4 x SSC/0,1 % Tween 20 equilibriert. Die Detektion erfolgte mit den folgenden Antikörpern in drei Reaktionsschritten:

	<b>Biotin-dUTP (grünes Fluorochrom)</b>	<b>Digoxigenin-dUTP (rotes Fluorochrom)</b>
1. Schicht	Avidin-FITC	Maus-Anti-Digoxigenin
2. Schicht	biotinyliertes Anti-Avidin	TexasRed-Kaninchen-Anti-Maus
3. Schicht	Avidin-FITC	TexasRed-Esel-Anti-Kaninchen

Beide Antikörper einer Schicht wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:200 in 4 x SSC/0,1 % Tween 20 zusammen eingesetzt. Die Präparate wurden mit 120 µl dieser Antikörperlösung eingedeckt und bei 37 °C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Zwischen den einzelnen Schichten wurden nicht gebundene Antikörper in drei Waschschritten mit 4 x SSC/0,1 % Tween 20 bei 45 °C für je 5 min entfernt.

Um die Chromosomen später identifizieren zu können, wurden die Präparate nach dem Waschvorgang für 10 min mit DAPI (4',6-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml in 2x SSC gegengefärbt, danach kurz in Wasser gespült und in einer aufsteigenden Ethanolserie dehydriert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit Antifade, einem speziellen Einbettmedium, das ein Ausbleichen (*Photobleaching*) während der Bildaufnahme verhindert, eingedeckt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

### 2.9.8 Bildaufnahme und Auswertung der CGH-Experimente

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer gekühlten CCD- (*charge-coupled device*) Kamera und einem daran gekoppelten Epifluoreszenz Mikroskop (DMRA, Leica) unter Verwendung der Computersoftware CW4000 Karyo, Version 1.3 (Leica). Von jedem Hybridisierungsareal wurden pro Probe etwa 10 geeignete Metaphasen unter Einsatz von drei spezifischen Bandpass-Filtern mit einem 100x-Objektiv unter Immersionsöl im 16-bit-Format aufgenommen. Zur Identifikation der Chromosomen wurde immer ein Bild mit dem DAPI-Filter aufgenommen. Bei indirekter Markierung der Tumor-DNA mit Biotin-dUTP kamen der FITC- und bei Digoxigenin-dUTP markierter Kontroll-DNA der TR-Filter zum Einsatz. Wurde für Kontrolleexperimente die Tumor-DNA mit Cyanin-3 oder Spectrum Orange (SO) direkt markiert, wurde der TRITC-Filter und bei Cyanin-5 direkt markierten Proben der Cy5-Filter verwendet. Aus drei Einzelbildern, ein Bild mit dem DAPI-Filter und jeweils ein Bild für den Tumor und die Kontrolle, wurde ein überlagertes Bild erstellt und im 8-bit-Format gespeichert.

Die weitere Bearbeitung erfolgte mit der Software CW4000 Karyo, Version 1.3 (Leica). Von den fünf bis sieben besten Metaphasen wurden anhand der DAPI-Bänderung die Chromosomen identifiziert und Karyogramme erstellt. Mit Hilfe der CGH-Software wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der FITC- und TR- Emission entlang der Chromosomen bestimmt und ein Durchschnittsprofil aller gemittelten Werte

errechnet. Die Schwellenwerte für Aberrationen wurden für Zugewinne (mehr grüne Fluoreszenz) auf 1,25 und für Verluste (mehr rote Fluoreszenz) auf 0,75 festgelegt. Die Zugewinne wurden im CGH-Profil als grüne senkrechte Linien rechts und die Verluste als rote senkrechte Linien links der schwarzen Mittellinie (keine Dosisunterschiede zwischen Test- und Kontroll-DNA) markiert. Der Grenzwert für eine Amplifikation wurde bei 1,5 und für eine Deletion bei 0,5 fixiert. Anhand der CGH-Profile konnte abgelesen werden, welche chromosomalen Regionen im Tumorgenom über- bzw. unterrepräsentiert oder unverändert sind.

Die CGH-Ergebnisse der jeweiligen Tumorguppen wurden mit Hilfe der Software in Histogrammen zusammengefasst. Daraus ließ sich die Häufigkeit rekurrenter Aberrationen einzelner Chromosomen oder Chromosomenbanden berechnen. Zur Auswertung der CGH-Ergebnisse wurden Veränderungen eines ganzen Chromosoms oder einer zusammenhängenden Region auf dem p- oder q-Arm als ein Ereignis, zwei separate Zugewinne, Amplifikationen, oder Verluste auf demselben Chromosomenarm als zwei Aberrationen gewertet. Bei Vorliegen von zwei Gewebeproben des gleichen Tumors einer Patientin wurde die Anzahl der Aberrationen vor den Berechnungen gemittelt, so dass jede Patientin nur ein Mal berücksichtigt wurde.

## 2.10 Hierarchische Clusteranalyse aller CGH-Daten

Mit der hierarchischen Ähnlichkeits- oder Clusteranalyse wurde das Ziel verfolgt, alle durch konventionelle CGH analysierten Tumore hinsichtlich ihrer genetischen Aberrationen, unabhängig vom histologischen Typ, auf Ähnlichkeit zu Gruppen (Clustern) zusammenzufassen (Eisen *et al.*, 1998). Die Gruppenbildung der Tumore erfolgte daher durch so genanntes nicht überwachtes Lernen „*unsupervised learning*“ mit Hilfe der Software „Genesis“, Version 1.6.0 Beta 1 (<http://genome.tugraz.at/Software/Genesis>) nach Sturn *et al.*, (2002).

Aus den CGH-Profilen aller analysierten Proben (n = 85), einschließlich aller analysierten Tumorproben (n = 72) und autologen Proben mit normalem Epithel (n = 13) wurden die genetischen Aberrationen in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Spalten enthielten die codierte Patienten-ID und in den Zeilen waren alle Cytobanden des Genoms, außer Chromosom Y, aufgelistet. Ohne Chromosom Y waren dies insgesamt 378 Banden nach ISCN, (Mitelman, 1995). Die CGH-Ergebnisse wurden als Zahlen verschlüsselt (0 keine Aberration, +1 Zugewinn, -1 Verlust, +2 Amplifikation, -2 homozygote Deletion) und der komplette Datensatz als Textdatei entsprechend dem vorgegebenen Dateiformat abgespeichert. Die Textdatei wurde mit dem Programm Genesis geöffnet und die Ähnlichkeit zwischen den Proben über die Abstandsmatrix nach der Pearson Korrelation und über den „*Average Linkage*“ Algorithmus berechnet. Als Ergebnis wurden Tumore mit ähnlichen Aberrationsmustern zu Gruppen zusammengefasst und ein Dendrogramm erstellt. Die Ähnlichkeit der Daten wurde über ihre Distanz zueinander bewertet, so dass benachbarte Äste im Dendrogramm sich ähnlicher sind als weiter entfernte.

## 2.11 Array-CGH-Analyse

Die Array-CGH-Analyse wurde unter Einsatz verschiedener Markierungstechniken an präamplifizierter DNA aus formalinfixiertem Gewebe ausgewählter Vorläuferstadien getestet, die zuvor schon mittels konventioneller CGH analysiert wurden. Als Referenz wurde gepoolte genomische DNA von 20 weiblichen Probanden verwendet.

Ziel der Untersuchung war es, die Array-CGH-Technik an Tumor-DNA mit einer limitierten DNA-Ausgangsmenge aus Archivmaterial zu etablieren, optimale Hybridisierungsergebnisse zu erzielen und diese mit den konventionellen CGH-Ergebnissen zu vergleichen.

Die Herstellung der Arrays bzw. Chips erfolgte in Kooperation zwischen dem Institut für Klinische Genetik der Technischen Universität Dresden und der Freien Universität Amsterdam. Sie war nicht Bestandteil dieser Arbeit (siehe Kooperationspartner in Kapitel 9.5). Von zirka 6.000 humanen BACs, die das gesamte Genom im Abstand von 0,5 bis 1 Mb abdecken (1 Mb Sanger Centre Set und mehr als 3.000 weitere BACs aus Projekten der beteiligten Gruppen), wurde die DNA präpariert und durch Ligations-PCR amplifiziert (Klein *et al.*, 1999; Snijders *et al.*, 2001). Dabei wurde der längere 21-mer Primer zusätzlich am 5'-Ende durch einen Aminolinker modifiziert, um ein besseres Anhaften der DNA-Spots am Substrat zu ermöglichen. Mit einem Roboter wurden wenige Nanoliter der sekundär amplifizierten DNA aus 96er Mikrotiterplatten in Triplikaten auf beschichtete Glasobjektträger (CodeLink Activated Slides, Amersham Biosciences) aufgebracht. Die einzelnen Spots wurden in 48 Blöcken (12 x 4) auf einem Chip zusammengefasst. Ein Block enthielt je nach Charge des Chips meist 20 x 20 einzelne Spots.

### 2.11.1 DNA- Markierung durch Random Priming

Bei der DNA-Markierung durch Random Priming wird genomische DNA denaturiert, so dass an die Einzelstränge Zufallsprimer aus acht Nukleotiden (Oktamere) binden können. Diese dienen als Startprimer für das Enzym Exo-Kleenow-Fragment, welches mit Fluoreszenzfarbstoffen direkt markierte Nukleotide wie z. B. Cyanin-3 (Cy3)-dUTP und Cyanin-5 (Cy5)-dUTP bei der Neusynthese des DNA-Stranges einbaut.

Für ein Chip-Experiment wurden insgesamt 600 ng Tumor- und 600 ng Kontroll-DNA separat durch Random Priming markiert, die später in der Fällungsreaktion miteinander vereinigt wurden (siehe Kapitel 2.11.4). Die für die Reaktion notwendigen Reagenzien wie Enzym, Nukleotidmix und Puffer waren Bestandteil des Kits „BioPrime Array CGH Genomic Labeling System“. Es wurden jeweils 2 Random Priming-Ansätze mit je 300 ng DNA in einer 50 µl Reaktion zur Markierung der Tumor- und Kontroll-DNA getrennt hergestellt. Die Tumor-DNA wurde mit Cy3-dUTP und die Kontroll-DNA mit Cy5-dUTP direkt markiert. Im ersten Reaktionsschritt wurden 300 ng genomische DNA und 20 µl 2,5x Random Primer in einem Volumen von 42 µl bei 100 °C für 10 min in der PCR-Maschine denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Danach wurden 5 µl Nukleotid-Mix für dUTPs, 2 µl Cy3-dUTP (25 nmol) bzw. Cy5-dUTP (25 nmol) und 1 µl

des Enzyms Exo-Kleenow-Fragment (40 U/  $\mu$ l) dazu pipettiert. Die Markierung erfolgte bei 37 °C über Nacht und wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l Stopp-Puffer beendet. Für Testexperimente zur Überprüfung der Sondenqualität auf Metaphasepräparaten waren halbe Ansätze mit 25  $\mu$ l ausreichend. Nicht eingebaute Nukleotide konnten durch eine Säule (Sephadex G-50 oder QiaQuick Purification Kit) entfernt werden. Das Eluat wurde visuell begutachtet und die Qualität der markierten DNA auf einem 1 %-igem Agarosegel überprüft. Die DNA-Fällung und weitere Behandlung der markierten Proben erfolgte wie in Kapitel 2.11.4 beschrieben.

### 2.11.2 DNA-Markierung durch Ligations-PCR

Die DNA-Markierung erfolgte ähnlich dem in Kapitel 2.9.3 beschriebenen Protokoll. Zur Reduktion von störender Hintergrundfluoreszenz auf den Chips wurden die direkt markierten Farbstoffe Cy3 zur Markierung der Tumor-DNA und Cy5 zur Markierung der Referenz-DNA eingesetzt und zum besseren Einbau der Nukleotide an dCTP und an dUTP gebundene Moleküle in Kombination mit dem Enzym Thermo Sequenase verwendet (mündliche Mitteilung Christoph Klein; Fuhrmann *et al.*, 2008). Die markierten DNA-Proben wurden wie in Kapitel 2.11.1 überprüft und anschließend gefällt.

### 2.11.3 Kontroll-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität

Bevor die durch Ligations-PCR präamplifizierte Tumor-DNA markiert und auf Chips hybridisiert wurde, wurde deren Qualität durch Kontroll-PCRs für je ein Fragment des *TP53*-Gens und des  *$\alpha$ -Catenin*-Gens überprüft. Als qualitativ gut haben sich PCR-Produkte erwiesen, die sich in einer genspezifischen Bande auf einem 2 %-igen Agarosegel auftrennen ließen.

Ein 20  $\mu$ l PCR-Ansatz war zusammengesetzt aus 4  $\mu$ l der präamplifizierten Tumor-DNA, 2  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 2,4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4  $\mu$ l dNTP (10 mM), 0,4  $\mu$ l 5'-Primer, 0,4  $\mu$ l 3'-Primer, 0,3  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (5U/ $\mu$ l) und 12,1  $\mu$ l Aqua dest.

Es wurden folgende Primerpaare verwendet:

Gen	Primer-Sequenzen	Annealing-Temperatur	Gen-Fragment
<i>TP53</i> (Ex6)	5' 5'-ACCATGAGCGCTGCTAAGAT-3'	62 °C	250 bp
	3' 5'-AGTTGCAAACCAGACCTC-3'		
<i><math>\alpha</math>-Catenin</i> (D5S500)	5' 5'-GTATCGGTGAAATGCAACTAC-3'	53 °C	134 bp
	3' 5'-CTTTTACATTTTTGGTACCTTG-3'		

Die Schritte in der PCR-Maschine waren:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
1	92 °C	5 min	
2	92 °C	30 s	40 Zyklen
3	50 bzw. 62 °C	15 s	
4	72 °C	30 s	
5	72 °C	5 min	
6	4 °C	∞	

#### 2.11.4 Vorbereitung der DNA-Sonden und der Prähybridisierungslösung

Die Präzipitation der markierten Tumor- und Kontroll-DNA sowie die Fällung von Lachssperma-DNA für den Prähybridisierungsmix erfolgten in einem Arbeitsschritt. Zur Fällung wurden Doppelansätze von markierter Tumor- und Kontroll-DNA (DNA-Markierung siehe Kapitel 2.11.1 und 2.11.2) unter Zugabe von 200 µl C<sub>0</sub>t-1 DNA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen kaltem 100 %-igem Ethanol miteinander vereint. Parallel dazu wurden zur Herstellung der Prähybridisierungslösung pro Array 650 µg Lachssperma-DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen kaltem 100 %-igem Ethanol gefällt. Alle Proben wurden bei -20 °C über Nacht präzipitiert und in gleicher Weise wie für die konventionelle CGH (siehe Kapitel 2.9.6) in 70 %-igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Die getrockneten Pellets wurden für mindestens 30 min in 13 µl Aqua dest. und 26 µl 20 %-igem SDS bei 37 °C im Thermomixer gelöst und nach Zugabe von 91 µl Hybridisierungsmix (50 % Formamid, 2x SSC, 10 % Dextransulfat, 4 % SDS, pH 7,0) für weitere 60 min geschüttelt. Zum Denaturieren wurden die markierten Proben für 10 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für weitere 60 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde nicht denaturiert und nach Vorbehandlung der Chips zur Reduktion unspezifischer Bindungen eingesetzt (siehe Kapitel 2.11.6).

#### 2.11.5 Vorbehandlung der Chips

Vor der Prähybridisierung und der eigentlichen Hybridisierung wurden die Chips in einer Blockierungslösung aus 0,1 M Tris, 50 mM Ethanolamine und 0,1 % SDS, pH 9,0 für 15 min bei 50 °C behandelt, um reaktive Aminogruppen zu inaktivieren. Danach wurden die Chips in 50 °C warmer 4xSSC/ 0,1 % SDS-Lösung für 15 min inkubiert, kurz in Millipore Wasser getaucht und anschließend durch 3-minütige Zentrifugation bei 1.000 rpm in 50 ml Röhrchen getrocknet. Vor der Prähybridisierungsreaktion wurden die Arrays für 2 min in kochendem Millipore Wasser denaturiert und durch Zentrifugation getrocknet.

### 2.11.6 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Arrays

Die folgenden Schritte der Prähybridisierung mit Lachssperma-DNA und die eigentliche Hybridisierung erfolgten in einer automatischen Hybridisierungsstation (HybArray 12, PerkinElmer) mit luftdicht verschließbaren Hybridisierungskammern. Vor Behandlung der Arrays wurden die Verbindungsschläuche zu den Hybridisierungskammern mit 50 °C warmen Millipore Wasser unter Vakuum gereinigt und Luftbläschen aus dem System entfernt. Nach Einlegen der vorbehandelten Chips (siehe Kapitel 2.11.5) in die Hybridisierungskammern und deren Befestigung am Gerät wurden 120 µl der vorbereiteten Prähybridisierungslösung (siehe Kapitel 2.11.4) über eine Kammeröffnung auf einen Array pipettiert und diese luftdicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte unter ständiger Bewegung der Lösung für 45 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Chips kurz in Millipore Wasser abgespült und trocken zentrifugiert.

Durch die Kammeröffnungen wurden die markierten und denaturierten DNA-Proben auf die Chips aufgetragen. Die Hybridisierung fand bei 37 °C für 48 h unter kontinuierlicher Bewegung der Sonde auf dem Chip statt.

Das Waschen der Arrays im Anschluss an die Hybridisierung erfolgte manuell in Anlehnung an das Protokoll von Zielinski und Kollegen unter ständiger Bewegung in 2x SSC/0,05 % Tween 20, pH 7,0 für 30 s bei 37 °C und danach in einer frischen Lösung für 60 s bei 44 °C (Zielinski *et al.*, 2005). Im nächsten Waschgang wurden die Chips bei 44 °C für 60 s in 50 % Formamid, 2x SSC/0,1 % Tween 20, pH 7,0 inkubiert und danach in 2x SSC/0,05 % Tween 20, pH 7,0 ebenfalls bei 44 °C 60 s lang. Zum Schluss wurden die Arrays bei 25 °C 30 s lang in 1x PBS/0,05 % Tween 20 Lösung gewaschen, danach zwei Mal kurz in Millipore Wasser abgespült und durch Zentrifugation getrocknet.

### 2.11.7 Scannen der Hybridisierungssignale und Auswertung der Daten

Mit einem konfokalen Laser-Scanner (Array Scanner 428<sup>TM</sup>, Affymetrix) wurden die Chips nach dem Waschvorgang unter Verwendung der Computer-Software Jaguar 2.0 bei einer Wellenlänge von 532 nm (Cy3-Kanal, Tumor-DNA) und 630 nm (Cy5-Kanal, Kontroll-DNA) eingelesen. Um eine Auswertung zu gewährleisten, sollten möglichst weniger als 10 Triplikate eine Sättigung des Fluoreszenzsignals aufweisen. Es wurde jeweils ein Cy3- und Cy5-Bild pro Chip gespeichert. Die Überlagerung der Bilder und deren Bearbeitung erfolgte mit der Software ImaGene (BioDiscovery, El Segundo, CA). Auffällige Spots ohne Fluoreszenzsignale, mit viel Hintergrund oder Areale mit ungleichmäßiger Hybridisierung wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Nachdem die Fluoreszenzintensitäten für Cy3 und Cy5 jedes einzelnen Spots ermittelt und die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert wurde, wurden die Rohdaten den entsprechenden Klonen und deren Position auf dem Chip mit Hilfe einer Gen-ID-Datei zugeordnet. Die Lokalisation der BACs im Genom entstammt dem UCSC Genome Browser (Stand April 2004, <http://genome.ucsc.edu>). Weiterhin wurden die Daten aus

einer mit ImaGene generierten Textdatei in eine Excel-Tabelle übertragen und analysiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte blockweise mit Hilfe des Programms „arrayCGHbase“ unter <http://medgen.ugent.be/arrayCGHbase> (Menten *et al.*, 2005). Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Cy3 zu Cy5 wurde aus den Triplikaten jeweils der Medianwert berechnet und dieser zur Basis 2 logarithmiert. Die grafische Darstellung der Verhältniswerte über das gesamte Genom oder einzelner Chromosomen erfolgte mit Excel. Von der Analyse ausgeschlossen wurden Werte mit einer Hintergrundfluoreszenz > 1000 im Cy5-Kanal (Kontroll-DNA), Triplikate mit zu schwachen Fluoreszenzintensitäten < 2000 und Werte mit einer Standardabweichung > 0,2. Bei zu starker Streuung der Einzelwerte (Standardabweichung unveränderter Chromosomen > 0,4) war eine sichere Interpretation des Ergebnisses nicht möglich.

Die Grenzwerte für Zugewinne oder Verluste wurden aus der Standardabweichung der  $\log_2$ -Werte einzelner unveränderter Chromosomen unter Einbeziehung des Medianwertes aberranter Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte (Zugewinn oder Verlust) ermittelt. Daraus resultierten als Grenzen für Zugewinne  $\log_2$ -Werte zwischen > 0,35 und 0,4 und als Grenze für Verluste  $\log_2$ -Werte zwischen < -0,35 und -0,4. Amplifikationen wurden auf Werte > 0,5 und Deletionen auf Werte < -0,5 festgelegt. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden als chromosomale Zugewinne oder Verluste nur Regionen gewertet, in denen mindestens drei aufeinander folgende BACs über den festgelegten Grenzwerten lagen, denn erfahrungsgemäß ist die Streuung der Einzelwerte bei Tumor-DNA aus Paraffinmaterial höher als bei DNA, die aus nicht fixierten Zellen isoliert wurde.

Zur vergleichenden Darstellung der konventionellen und Array-CGH-Ergebnisse wurden die Aberrationen (Zugewinne oder Verluste) aus einer Textdatei in vorgegebener CGH-Karyotyp-Schreibweise mit Hilfe des Online-Analyse-Programms CyDAS (*Cytogenetic Data Analysis System*; <http://www.cydas.org/OnlineAnalysis>) in das Ideogramm-Format (Auflösung 550 Banden) umgewandelt (Hiller *et al.*, 2005).

## 2.12 Interphase-FISH

### 2.12.1 Herstellung von Imprints, Zytospin- und Schnittpräparaten

Die Herstellung von zytologischen Präparaten aus frischem, unfixierten Tumorgewebe und von Paraffinschnitten für die FISH-Analyse an Interphasekernen erfolgte durch die Kooperationspartner in Kiel und Berlin (siehe Kapitel 9.5).

Zur Anfertigung von Imprints, auch als Abklatschpräparate bezeichnet, wurde frisches Tumorgewebe mit einem Skalpell angeschnitten und mehrfach leicht auf einen beschichteten Glasobjektträger aufgedrückt. Auf der Oberfläche des Objektträgers blieben einzelne Tumorzellen und Zellcluster haften. Die Präparate wurden anschließend mit Carnoy's Fixativ, einem Gemisch aus Methanol-Eisessig (Verhältnis 3:1), für 20 min fixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) dehydriert und bei -80 °C aufbewahrt.

Zytospinpräparate wurden z. T. aus dem gleichen OP-Material wie die Imprints aus einer Suspension von Tumorzellen hergestellt. Mit einer Spritze wurden aus frischem Tumorgewebe Zellen aspiriert (simulierte Feinnadelaspiration) und diese in 1x PBS-Medium aufgenommen. Durch Zentrifugation mit einer Zytocentrifuge für 5 min bei 400 x g wurde die Zellsuspension auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht und in gleicher Weise wie die Imprints fixiert, dehydriert und gelagert.

Von formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden vier serielle Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt, diese auf SuperFrost Plus Objektträger gezogen und durch Erhitzen für 2 h auf einer Wärmeplatte bei 58 °C fixiert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

### 2.12.2 Vorbehandlung der Präparate

Die Vorbehandlung der Imprint- und Zytospinpräparate für die Interphase-FISH glich der Behandlung von Objektträgern mit Metaphasechromosomen, wie sie für die konventionelle CGH-Analyse verwendet wurden (siehe Kapitel 2.9.2). Auf Grund der unterschiedlichen Zugänglichkeit des Pepsins zu Bereichen separat liegender Zellen und Zellaggregaten musste die Enzymbehandlung unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und die Auswahl der Hybrisierungsregionen entsprechend ausgerichtet werden.

Für Paraffinschnitte war eine aufwendigere Vorbehandlung erforderlich. Nach Deparaffinierung (siehe Kapitel 2.2.1) wurden die getrockneten Schnitte für 60 min in 0,2 M HCl-Lösung verdaut. Anschließend wurden die Präparate für 3 min in Millipore H<sub>2</sub>O rehydriert. Auf die Gewebeschnitte wurde 1 M NaSCN-Lösung pipettiert, diese mit einem Deckglas versehen und bei 37 °C in einer befeuchteten Kammer über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 x SSC für je 5 min erfolgte der Verdau des Gewebes mit Pepsin. Dazu wurde eine Lösung mit 2 mg/ml Pepsin in 0,9 % NaCl, pH 1,5 hergestellt und auf 37 °C vorgewärmt. Die Behandlung wurde zirka alle 2 bis 5 min mit dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und dauerte insgesamt zwischen 10 und 60 min. Ziel der Behandlung war es, möglichst viel Gewebe zu verdauen, ohne die Zellkerne anzugreifen. Die weitere Behandlung der Schnittpräparate nach dem Pepsinverdau erfolgte wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben und die Co-Denaturierung (siehe Kapitel 2.12.7) wurde zwei Mal für je 3 min durchgeführt.

### 2.12.3 Auswahl von BACs zur Generierung von FISH-Sonden

Zur Generierung von lokusspezifischen FISH-Sonden wurden BACs (*bacterial artificial chromosomes*), die Fragmente des humanen Genoms bis 300 kb Länge enthalten, aus der Datenbank des UCSC Genome Browsers (<http://www.genome.ucsc.edu>; Stand Juli 2003) herausgesucht und beim RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) bestellt. Die Klone für die Region 8q24 stammten aus der DNA-Bibliothek des Instituts für Molekulare Biotechnologie in Jena.

Die Auswahl der zu testenden Marker basierte auf Literaturrecherchen, vor allem unter Einbeziehung von publizierten CGH- und LOH (*loss of heterozygosity*)-Ergebnissen und anhand der eigenen CGH-Ergebnisse von Vorläuferläsionen und invasiven Karzinomen. Berücksichtigung fanden insgesamt acht Regionen, die beim Mammakarzinom besonders häufig verändert sind und Aberrationen, die schon bei Vorläuferläsionen mit hoher Frequenz auftreten. Dabei wurden Chromosomenabschnitte gewählt, die bekannte Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene enthalten.

Für jede der acht in Tabelle 2.6 gezeigten chromosomalen Regionen wurde, die entsprechende Genregion überspannend, ein Contig aus drei in ihrer Sequenz überlappende Klone zusammengestellt. Vollständig sequenzierte und bereits durch FISH kartierte Klone wurden bevorzugt ausgewählt. BACs, die nach Überprüfung der zytogenetischen Lokalisation auf andere Chromosomen hybridisierten oder Kreuzhybridisierungen zeigten (zirka 10 %), wurden ausgeschlossen und dafür andere Klone aus der Region bestellt.

**Tabelle 2.6: Zur Generierung von lokusspezifischen FISH-Sonden verwendete BACs und deren Lokalisation im Genom**

*Zur Herstellung lokusspezifischer DNA-Sonden wurde die DNA von drei in ihrer Sequenz überlappenden BACs miteinander gepoolt. Dies bewirkt eine Verstärkung der Fluoreszenzsignale nach der Hybridisierung und verbessert die Auswertung. Unterstrichene Klone überspannen die aufgeführten Gene.*

Bezeichnung der Klone			Genomische Region	Gene innerhalb der Region
<u>RP11-148k15</u>	RP11-155f3	<u>RP11-23i7</u>	1q32.1	<i>GAC1</i>
<u>RP1-80k22</u>	GS1-2d9	RP11-709e21	8q24.21	<i>MYC</i>
RP11-77f13	<u>RP11-380g5</u>	<u>RP11-165m8</u>	10q23.31	<i>PTEN</i>
<u>RP11-699m19</u>	RP11-626h12	<u>RP11-124k14</u>	11q13.3	<i>CCND1</i>
RP11-615i2	<u>RP11-354n7</u>	RP11-123c5	16q22.1	<i>CDH1, CDH3</i>
<u>RP11-199F11</u>	RP11-186b7	RP11-104h15	17p13.1	<i>TP53</i>
<u>RP11-94L15</u>	RP11-387h17	RP11-749i16	17q12-21.2	<i>HER-2/neu</i>
<u>RP4-724e16</u>	<u>RP11-1f20</u>	<u>RP4-700g13</u>	20q13.2	<i>ZNF217, CYP24A1, BCAS1</i>

#### 2.12.4 DNA-Gewinnung durch Maxipräparation

Die BACs wurden aus den gelieferten Stichtkulturen von *Escherichia coli* auf LB-Agar (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH7,5)/ 1,5 % Bacto-Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Pro Klon wurde eine Einzelkolonie mit einer sterilen Öse abgenommen und 200 ml des TB-Mediums (12 g/l Bacto-Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml/l Glycerin, 0,017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) plus 12,5 µg/ml

Chloramphenicol damit angeimpft. Die Bakterien vermehrten sich in 12 bis 18 h bei 37 °C unter Schütteln bei 300 rpm.

Vor der Maxipräparation wurde ein Glycerinstock aus 500 µl der Übernachtskultur und 500 µl 100 % Glycerin angelegt und bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurde die Kultur für 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert und das Pellet auf Eis mit 20 ml Lösung 1 (10 mM EDTA) resuspendiert. Danach wurden die Bakterien unter stark alkalischem pH mit 40 ml Lösung 2 (0,75 % SDS/ 0,15 N NaOH) für 10 min auf Eis lysiert. Zum 15 minütigen Neutralisieren wurden dem Gemisch 30 ml kalter Lösung 3 (3M KOAc) hinzugefügt. Um einen sauberen Überstand ohne Reste von Zelltrümmern zu gewinnen, folgten zwei Zentrifugationsschritte, jeweils für 15 min bei 12.000 rpm. Die DNA im Überstand wurde mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 5.000 rpm wurde das Pellet in 8 ml Lösung 4 (10mM Tris-HCl, pH 8,0/ 50 mM EDTA) resuspendiert, mit 4 ml Lösung 5 (7,5 M KOAc) ergänzt und 30 min auf Eis gekühlt. Danach wurde bei 7.000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand mit der DNA in 24 ml 100 % Ethanol gefällt und für 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 700 µl TE-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0/ 50 mM EDTA) aufgenommen und die verbliebene RNA mit 10 µl RNase (20 mg/ ml) 1 h verdaut. Die DNA wurde in zwei Phenol-Chlorophorm-Extraktionsschritten und einer Extraktion mit Chlorophorm gereinigt, mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt, mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und das DNA-Pellet über Nacht in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5/ 1 mM EDTA) gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photospektrometrisch bestimmt und die DNA-Proben bei 4 °C gelagert.

### **2.12.5 Kombination der FISH-Sonden zu Sondensets**

Aus der isolierten BAC-DNA wurden FISH-Sonden hergestellt und so kombiniert, dass jeweils ein Marker für niedriggradige Malignität und ein Marker für einen hochmalignen Tumor in einer Sondenkombination vereinigt wurden. Als interne Hybridisierungskontrolle wurden Zentromersonden eingesetzt, die ein Chromosom markieren, das unbeteiligt am Geschehen des Brustkrebs ist. Diese zusätzliche Sonde ist auch sinnvoll, um G<sub>2</sub>-Phase-Kerne mit doppeltem DNA-Gehalt und tetraploide Kerne zu identifizieren. Um einer Fehlinterpretation durch die ausschließliche Einbeziehung einer zusätzlichen Sonde vorzubeugen, wurden kommerzielle Zentromersonden der Chromosomen 2 und 4 (CEP-2 und CEP-4) gewählt. Sie wurden jeweils zwei Sondensets zugeordnet. Die Anzahl der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden im Set wurde auf drei begrenzt (siehe Tabelle 2.7).

**Tabelle 2.7: Kombination der FISH-Sonden**

Jedes der vier Sondensets umfasste drei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden, eine mit Spectrum Orange (SO) direkt markierte kommerzielle Zentromersonde (CEP) als Kontrolle und zwei mit Biotin-dUTP und Digoxigenin-dUTP indirekt markierte Sonden der ausgewählten Genregionen als Tumormarker. In den Spalten neben den Genregionen steht die jeweils zu erwartende Aberration (Zugewinn oder Verlust).

Set	Bio-dUTP		Dig-dUTP		SO-dUTP
	Genregion	Aberration	Genregion	Aberration	
1	20q13.2 (*)	Zugewinn	17p13.1 (*)	Verlust	CEP-2
2	8q24.21 (hm)	Zugewinn	10q23.31 (nm)	Verlust	CEP-4
3	17q12-21.2 (hm)	Zugewinn	1q32.1 (nm)	Zugewinn	CEP-2
4	11q13.3 (hm)	Zugewinn	16q22.1 (nm)	Verlust	CEP-4

Definition des Sondensets: nm = niedrig maligne, hm = hochmaligne, (\*) Malignitätspotential muss genauer abgeklärt werden.

### 2.12.6 Markierung der BAC-DNA und Präzipitation

Als Markierungsreaktion wurde die Nick Translation gewählt, da sie im Vergleich zu anderen Methoden wie z. B. PCR-basierter Markierung, Random Priming oder chemischer Markierungsmethoden die stärksten Signalintensitäten mit geringer Hintergrundfluoreszenz ermöglichte. Um die Signalintensitäten zu verstärken, wurde die DNA von drei überlappenden BACs einer Region entsprechend Tabelle 2.6 vor der gemeinsamen Markierung gepoolt. Weil der rote Spektralbereich durch die direkte Markierung der Zentromerproben mit Spectrum Orange bereits abgedeckt war, wurden die Tumormarker eines Sets indirekt mit Biotin-dUTP und Digoxigenin-dUTP markiert. Das Digoxigenin-dUTP wurde durch an Antikörper gekoppeltes Cy5 detektiert und der Direktmarkierung mit Cy5-dUTP auf Grund stärkerer Signalintensitäten vorgezogen. In Anlehnung an die in Kapitel 2.9.5 beschriebene Nick Translation für die CGH wurde meist ein halbiertes Reaktionsansatz von 50 µl, der 300 ng bis 2 µg BAC-DNA enthielt, hergestellt. Als einzige Modifikation wurden in einem 50 µl-Ansatz 2 µl DNase I (1:100 verdünnt) verwendet. Optimale Hybridisierungen wurden mit Fragmentlängen zwischen 300 und 600 bp erzielt.

In der Fällungsreaktion wurden beide Produkte nach der Nick Translation für ein Sondenset vereint und wie in Kapitel 2.9.6 beschrieben präzipitiert. Dabei war der Einsatz von 5 bis 10 µl C<sub>0</sub>t-1 DNA ausreichend. Nach Zentrifugation wurde das getrocknete Pellet in 11 µl Hybridisierungsmix gelöst und 1 µl der entsprechenden Zentromersonde dazugegeben.

### 2.12.7 Denaturierung, Hybridisierung und Detektion

Im Unterschied zur CGH war für die FISH-Analyse eine Co-Denaturierung von Interphasekernen und Metaphasechromosomen sowie der Sonden-DNA möglich. Dazu wurde der in Kapitel 2.12.6 hergestellte Sondenmix (Kombination von zwei Sonden unterschiedlicher Tumorregionen und einer Zentromersonde) auf das Hybridisierungsareal des vorbehandelten Präparates pipettiert, mit einem Deckglas versehen und mit Fixogum abgedichtet. Nach Trocknen des Klebers wurden Sonde und Präparat drei Minuten lang zusammen bei 75 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung in einer feuchteten Kammer bei 37 °C über Nacht. Das Waschen der Präparate, die Verdünnung der Antikörper, die DAPI-Färbung und das Eindecken der Präparate wurde in gleicher Weise wie für die CGH durchgeführt (siehe Kapitel 2.9.7). Die Detektion erfolgte in zwei statt in drei Schritten unter Verwendung folgender Antikörper:

	<b>Biotin-dUTP (grünes Fluorochrom)</b>	<b>Digoxigenin-dUTP (rotes Fluorochrom)</b>
1. Schicht	Avidin-FITC	Maus-Anti-Digoxigenin
2. Schicht	-	Cy5-Ziege-Anti-Maus

### 2.12.8 Bildaufnahme und Auswertung der FISH-Signale

Die mikroskopische Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit dem in Kapitel 2.9.8 beschriebenen Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der Computersoftware CW4000 FISH, Version Y 1.3. (Fa. Leica). Mit einem 40x-Objektiv wurden aus der hybridisierten Region 15 bis 20 Bilder im 16 bit-Format aufgenommen, um eine nachträgliche Skalierung und ein besseres Auszählen der Signale zu ermöglichen. Aus vier Einzelbildern im DAPI-, FITC-, TRITC- und Cy5-Kanal wurde durch die Auswertesoftware ein überlagertes Bild erzeugt (siehe Kapitel 2.9.8). Die mit Spectrum Orange markierten Zentromersonden wurden mit dem TRITC-Filter fotografiert. Für die Bildaufnahme an Gewebeschnitten war zu berücksichtigen, dass auf Grund der Schnittdicke Signale auch außerhalb der Fokusebene liegen konnten. Um alle Signale eines Kerns zu erfassen, wurden Fotos in sechs bis zehn Schnittebenen im Abstand von 0,5 µm aufgenommen (Multifokusfunktion) und als überlagertes Bild gespeichert. Für Imprints, Zytospin- und Kontroll-Präparate war diese sehr zeitaufwendige Art der Bildaufnahme nicht erforderlich.

Zur Überprüfung der Hybridisierungsqualität und Auswertbarkeit der FISH-Signale wurde jedes Sonden-Set zusätzlich auf ein Präparat mit normalen männlichen Metaphasen und Interphasekernen hybridisiert. Dazu mussten folgende Kriterien erfüllt sein: 1) zwei Signale pro Sonde und Interphasekern, 2) ausreichende Fluoreszenzintensitäten bei geringer Hintergrundfluoreszenz, um mögliche Artefakte, die als falsch positive Signale gewertet werden könnten, zu vermeiden, 3) keine Kreuzhybridi-

sierungen der Zentromersonden auf anderen Chromosomen, 4) Überprüfung der Lokalisation der generierten BAC-Sonden.

Pro Hybridisierungsspot wurde von möglichst 200 einzeln liegenden Zellkernen die Anzahl der Fluoreszenzsignale ausgezählt und der jeweilige Medianwert berechnet. Die Klassifizierung erfolgte nach der durchschnittlichen Anzahl an Signalen pro Kern in monosom (1 Signal), disom (2 Signale) und polysom (> 2 Signale). Kerne ohne Fluoreszenzsignale wurden nicht berücksichtigt. Für Gewebeschnitte musste zusätzlich beachtet werden, dass durch das Anschneiden einiger Zellen nur ein Signal pro Kern vorhanden sein kann, obwohl die betreffende Region genetisch nicht verändert ist. Außerdem war das Auszählen durch übereinander liegende Zellen erschwert, so dass sich die Signale nicht immer eindeutig einer Zelle zuordnen ließen. Starke Fluoreszenz von angrenzendem Gewebe konnte ebenfalls die Auswertung beeinträchtigen.

## 2.13 Statistische Auswertung und Berechnungen

Sämtliche statistische Analysen sowie die Erstellung von Diagrammen wurden mit dem Programm Statistica (Version 5.5) und mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt. Um einen besseren Überblick über die Häufigkeitsverteilung der Aberrations- und immunhistochemischen Daten zwischen den verschiedenen Tumorgruppen zu gewinnen, wurden als deskriptive Statistik der Median, die 25 %- und 75 %-Quantile sowie der minimale und maximale Wert berechnet und als Boxplot-Diagramm graphisch dargestellt. Für alle Auswertungen wurde eine statistische Signifikanz bei einem Wert von  $p \leq 0,05$  angenommen und hochsignifikante Ergebnisse mit einem Wert von  $p \leq 0,01$  festgelegt.

Zum Vergleich von zwei Gruppen, wie z. B. dem Vergleich der Anzahl an Aberrationen und dem Vergleich der immunhistochemischen Daten zwischen verschiedenen Tumorstadien wurde der **Mann-Whitney-U-Test** (U-Test) angewandt. Zur Auswertung der immunhistochemischen Daten wurde bei Vorliegen von Ergebnissen aus zwei Gewebelöcken einer Patientin das prognostisch ungünstigere Ergebnis einbezogen (z. B. negativer Rezeptorstatus, HER-2/neu positive Färbung und hohe Anzahl an Aberrationen). Der **Chi-Quadrat-Test** wurde zum Vergleich der CGH-Ergebnisse und denen der immunhistochemischen Analysen für HER-2/neu herangezogen. Als HER-2/neu positives Ereignis wurden bei Auswertung der Immunhistochemie Score-Werte von 2+ und 3+ gewertet und bei den CGH-Ergebnissen ein Zugewinn oder eine Amplifikation auf der Chromosomenbande 17q21. Zum Vergleich der Medianwerte von Interphase-FISH- und CGH-Ergebnissen wurde der gepaarte **Wilcoxon-Test** verwendet.

Die Berechnung der prozentualen Übereinstimmung (x) von den mittels konventioneller CGH bestimmten Aberrationen in zwei Gewebeproben der gleichen Patientin erfolgte mit folgender Formel nach Waldman *et al.*, (2000):

$$X = \frac{\text{Anzahl der gemeinsamen Aberrationen}}{(\text{gemeinsame Aberrationen}) + [1/2 \times (\text{Aberrationen nur in Gewebe a} + \text{Aberrationen nur in Gewebe b})]}$$

Dabei wurden Proben, bei denen in beiden Anteilen keine Aberrationen gefunden wurden, nicht berücksichtigt.

## 2.14 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

### Kits

BioPrime Array CGH Genomic Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe
ChemMate TM Detection Kit, APAAP und LSAB	Dako, Hamburg
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
GenomiPhi DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences, Freiberg
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### Enzyme

BioTherm DNA-Polymerase	GeneCraft, USA
DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> )	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
<i>Mse</i> I (50 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
Super <i>Taq</i> -Polymerase (15U/μl)	CPG, USA
T4 DNA Ligase	Natutec, Frankfurt
Thermo Sequenase DNA Polymerase	Amersham Biosciences, Freiberg
Tru I	Fermantas GmbH, St. Leon-Rot

### PCR-Primer

Die Primer wurden durch MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert.

CAB-21	5'-CTG TGT CTG ACG ACT CAG TCT-3'
ddCAB-12	5'-TAA GAC TGA GTC-dideoxy C-3'
ddMse11	5'-TAA CTG ACA G-dideoxy C-3'

DOP-Primer Telenius	5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'
LIB1	5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'

### Fluoreszenz-/ Haptenmarkierte dNTPs

Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Cyanin-3-dCTP	Amersham Biosciences, Freiberg
Cyanin-3-dUTP	Amersham Biosciences, Freiberg
Cyanin-5-dCTP	Amersham Biosciences, Freiberg
Cyanin-5-dUTP	Amersham Biosciences, Freiberg
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim

### Kommerzielle FISH-Sonden

CEP-2 Spectrum Orange	Vysis, Wiesbaden
CEP-4 Spectrum Orange	Vysis, Wiesbaden

### Antikörper

Antikörper für HER-2/neu, Ki-67, PgR und ER (siehe Tabelle 2.3)	Dako, Hamburg
Avidin-FITC	Jackson, USA
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector, USA
Cy5-Ziege-Anti-Maus	Jackson, USA
Maus-Anti-Digoxigenin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TexasRed-Kaninchen-Anti-Maus	Jackson, USA
TexasRed-Esel-Anti-Kaninchen	Jackson, USA

### Andere Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
ATP	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Agar	Gibco BRL, USA
Bacto-Trypton	Gibco BRL, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Jackson, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Colcemid	Roche, Mannheim
C <sub>0</sub> t-1 DNA, human	Roche, Mannheim
DAPI (4',6-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid)	Roche, Mannheim

---

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche, Mannheim
Dextran Sulfat	AppliChem, Darmstadt
DNA-Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
EDTA	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	Baker, Deventer
Ethanolamine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, USA
Fixogum (Montagekleber)	Marabu, Tamm
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Igepal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lachssperma DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mountex	Medite, Burgdorf
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
One-Phor-All-Buffer Plus (OPA-Puffer)	Amersham Biosciences, Freiburg
PBS	Biochrom, Berlin
PCR-Puffer D	Invitrogen, Karlsruhe

Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phytohämagglutinin (PHA)	Biochrom, Berlin
RPMI Medium 1640 mit L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schiff'sches Reagenz	Merck, Darmstadt
SDS	AppliChem, Darmstadt
SSC	Invitogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TRIS HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

### **Verbrauchsmaterialien**

Caps zur Mikrodisektion (CapSure LCM Caps)	Arcturus, USA
Deckgläser 18x18 und 24x60	Menzel, Braunschweig
Falcon-Röhrchen	Falcon, Osnabrück
Glas-Küvetten	Roth, Karlsruhe
Klebeband	Roth, Karlsruhe
Mikrodisektionsfolie (Durchmesser 2 µm)	MMI, Glattbrugg, Schweiz
Objektträger (Mattrand)	Menzel, Braunschweig
Objektträger (SuperFrost Plus)	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger mit Abstandshaltern (ChemMate Capillary Gap Microscope Slides)	Dako, Hamburg
Probe Quant G50 Micro Columns	Amersham Biosciences
Reaktionsgefäße 0,2, 0,5 und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

### **Geräte**

Brutschrank	Heraeus B 6060
DNA-Messgerät	BioPhotometer, Eppendorf
DNA-Zytometrie-System	Ahrens, Bargteheide
Elektrophorese-Netzgerät	
Elektrophorese-Kammer	
Mikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss

---

Färbeautomat	Immunostainer Tech Mate Horizon, Dako, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera	DMRA, Leica und Photometrix, Quantix
Kühlzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Laser-Mikrodissektionsgeräte	MMI, Glattbrugg, Schweiz und P.A.L.M., Bernried
PCR-Maschinen, PTC-100 und PTC-200	MJ Research, Inc
Phasenkontrastmikroskop	DME, Leica
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrowelle	Bosch
Mini-Zentrifuge	Labnet International
Hybridisierungsstation	HybArray 12, PerkinElmer
ph-Meter	Hanna Instruments
Pipetten	Gilson
Scanner für Arrays	Affymetrix 428 Array Scanner
Schüttler	IKA-Werke, Staufen
Slide Warmer	FISHer Scientific
SpeedVac	Concentrator 5301, Eppendorf
Waage	Ohaus
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	diverse Hersteller
Zytozentrifuge Typ Universal 16A	Hettich, Tuttlingen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Methodischer Vergleich zur Amplifikation und Markierung genomischer DNA für konventionelle CGH-Analysen

Hintergrund der Experimente zur Vervielfältigung (Amplifikation) und Markierung genomischer DNA war es, optimale Methoden speziell für isolierte DNA aus formalinfixiertem Gewebe zu finden, die auch für geringe DNA-Mengen im einstelligen ng-Bereich geeignet sind. Eine gleichmäßige Amplifikation von Tumor-DNA und der bestmögliche Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in die DNA bilden die Voraussetzung für optimale CGH-Ergebnisse. Ziel war es, die CGH-Technik an DNA aus lasermikrodissezierten Tumorzellen von Brustkrebsvorstufen wie duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS), lobulärem Carcinoma *in situ* (LCIS) und atypisch duktales Hyperplasie (ADH) einzusetzen, um deren genomischen Veränderungen aufzudecken.

Es wurden folgende Methoden zur Amplifikation genomischer DNA verschiedener Gewebe durchgeführt und die Ergebnisse vergleichend gegenübergestellt: 1) DOP-PCR, 2) Ligations-PCR und 3) „*Multiple Strand Displacement Amplification*“ (MDA). Da auch die Art der DNA-Markierung einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg einer Hybridisierung hat, wurden PCR-basierte Markierungsmethoden sowie die Methode der Nick Translation geprüft. Anhand der CGH-Profile, der Fluoreszenzintensitäten und der Hintergrundfluoreszenz wurde die Hybridisierung beurteilt und festgestellt, ob die Amplifikation über das gesamte Genom gleichmäßig erfolgte. Als Kontrollen dienten nicht fixierte und nicht amplifizierte genomische DNA aus Lymphozyten (XY versus XX) und genomische DNA der Tumorzelllinie SKBR3 versus XX, die durch Nick Translation mit Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP markiert wurde.

#### 3.1.1 DOP- und Ligations-PCR

In CGH-Experimenten mit 200 ng genomischer DNA aus Lymphozyten (XY versus XX) konnte nach Amplifikation durch DOP- und Ligations-PCR gezeigt werden, dass es von Vorteil war, das Genom von Test- und Kontroll-DNA gleichermaßen zu amplifizieren. Wurde nur eine DNA amplifiziert, zeigten sich nach Ligations-PCR bei sonst glattem Profil geringe Abweichungen in den Regionen um die Telomere. Nach DOP-PCR hingegen wurden trotz guter Signalintensitäten und geringem Hintergrund falsche Verluste an den Telomeren (z. B. 1pter und 9pter) beobachtet und bei den Chromosomen 17, 19 und 22 kam es zum artifiziellen Verlust des ganzen Chromosoms. Falsch positive Veränderungen dieser Art ließen sich durch Amplifikation beider Genome komplett vermeiden. Die CGH-Profile nach DOP- und Ligations-PCR unterschieden sich nicht mehr von einander. Auch mit Tumor-DNA der Zelllinie SKBR3 versus XX konnten nach Amplifikation beider Genome sowohl durch DOP- als auch

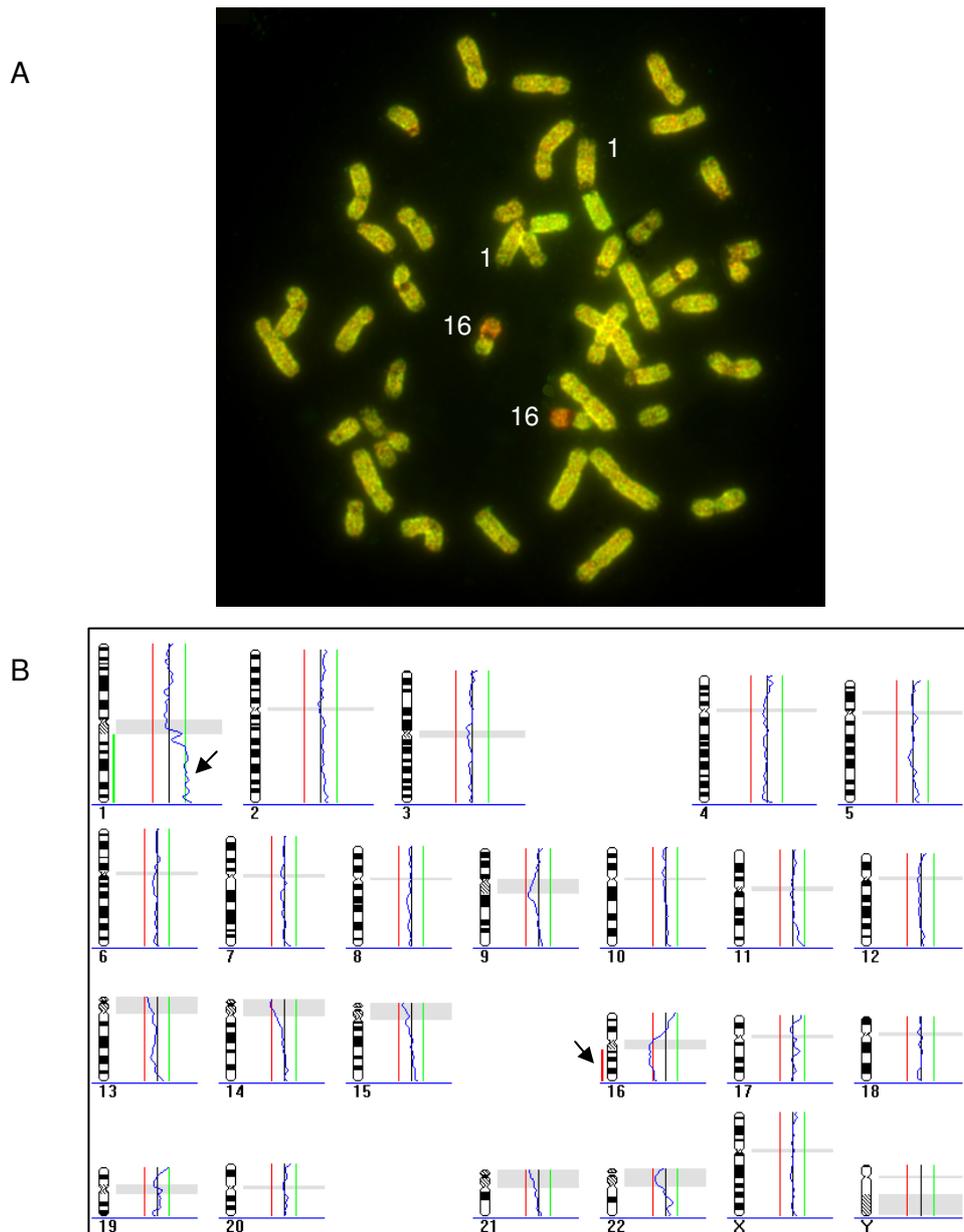
durch Ligations-PCR alle bekannten Aberrationen genauso gut wie mit nicht vervielfältigter DNA aufgedeckt werden.

Ein Vergleich der DNA-Markierung durch Nick Translation und Markierungs-PCR nach DOP- und auch nach Ligations-PCR an unfixierter genomischer DNA erbrachte keine qualitativen Unterschiede im CGH-Profil. Bei der Ligations-PCR mit anschließender Markierungs-PCR war häufig eine starke Fluoreszenzmarkierung der zentromerischen Region von Chromosom 9 auffällig, die sich aber meist nicht nachteilig auf die Berechnung des Profils auswirkte. An extrahierter DNA von Gewebeschnitten aus Paraffinmaterial war jedoch die Markierungs-PCR nach Amplifikation durch Ligations-PCR gegenüber der Nick Translation von deutlichem Vorteil. Die Profile waren gleichmäßiger, besonders an den Telomeren und auch die chromosomalen Aberrationen waren klarer zu erkennen. Alternativ zur indirekten PCR-Markierung durch Biotin- und Digoxigenin-dUTP führte der Einsatz der direkten Fluoreszenzfarbstoffe Spectrum Green und Spectrum Orange zu äquivalenten CGH-Profilen. Nach Amplifikation durch DOP-PCR waren beide Markierungsreaktionen etwa gleichwertig.

Insgesamt waren die Aberrations-Peaks nach Vervielfältigung des Genoms nicht ganz so deutlich wie mit nicht präamplifizierter DNA. Im Gegensatz zu nicht fixierter DNA wurden am Paraffinmaterial deutliche Unterschiede zwischen DOP- und Ligations-PCR festgestellt. Nach DOP-PCR mit folgender Markierungs-PCR wurden einige Aberrationen nicht erkannt und andere waren artifiziell im Vergleich zur nicht amplifizierten DNA desselben Tumors. Falsche Zugewinne von genetischem Material traten in den Chromosomenregionen 1p33-ter, 9qter und 12qter auf. Außerdem wurden komplette Zugewinne der Chromosomen 17, 19 und 22 beobachtet. Nach DNA-Amplifikation durch Ligations-PCR und PCR-basierter Markierung wurden alle Aberrationen erkannt. Einige Schwankungen im Profil wurden bei den Chromosomen 4, 5, 12 und 17 beobachtet. Dies ließ sich verhindern, indem umgekehrt zu der sonst üblichen Weise das Amplifikat der Tumor-DNA mit Digoxigenin-dUTP und das der Kontroll-DNA mit Biotin-dUTP markiert wurde (persönliche Mitteilung durch Herrn Christoph Klein). Auch mit 1 ng Tumor-DNA, isoliert aus Paraffinmaterial, konnten mittels Ligations-PCR noch alle Aberrationen eindeutig detektiert werden. Eine zusätzliche Aufreinigung der PCR-Produkte durch Sephadex-Säulen oder Präzipitation der DNA vor der Markierungsreaktion führte bei keiner der Methoden zu einer Verbesserung des Hybridisierungsergebnisses.

Nachdem sich die Ligations-PCR als die vorteilhaftere Amplifikationsmethode an isolierter DNA aus Paraffinmaterial erwiesen hatte und sie sich auch sehr gut zur Amplifikation von DNA-Konzentrationen im einstelligen ng-Bereich geeignet war, wurde sie in Kombination mit der Markierungs-PCR an laser-mikrodisseziertem Tumorgewebe angewandt. Da von den Gewebeschnitten der analysierten Brustkrebsvorstufen zum Teil nur sehr kleine Tumorareale von zirka 0,5 bis 1,0 mm<sup>2</sup> durch Laser-Mikrodissektion separiert werden konnten, war es erforderlich, die nach dem Proteinase K-Verdau aufgeschlossene genomische DNA direkt einem *Mse I*-Verdau, dem ersten Teilschritt

der Ligations-PCR, zuzuführen. Eine vollständige DNA-Extraktion nach verschiedenen Standardmethoden unter Verwendung von Glykogen als Trägermaterial zur Unterstützung der DNA-Fällung führte zu keinem Ergebnis. Überraschenderweise waren die CGH-Profile nach kombiniertem Einsatz von Laser-Mikrodissektion, Ligations-PCR und Markierungs-PCR deutlich gleichmäßiger als nach direkter DNA-Extraktion aus kompletten Gewebeschnitten ohne DNA-Amplifikation und Markierung durch Nick Translation. In Abbildung 3.1, A ist die Hybridisierung von DNA aus laser-mikrodisseziertem Gewebe eines LCIS auf normale Metaphasechromosomen und in Abbildung 3.1, B das zugehörige Gesamtprofil dargestellt.



**Abbildung 3.1: Hybridisierung von DNA eines LCIS nach Laser-Mikrodissektion und Genomamplifikation durch Ligations-PCR**

*Nach Laser-Mikrodissektion wurde die aufgeschlossene Tumor-DNA (Probe 77-LCIS) und die weibliche Kontroll-DNA durch Ligations-PCR amplifiziert, indirekt mit Biotin- bzw. Digoxigenin-DUTP durch PCR markiert und zusammen auf weibliche Metaphasen hybridisiert.*

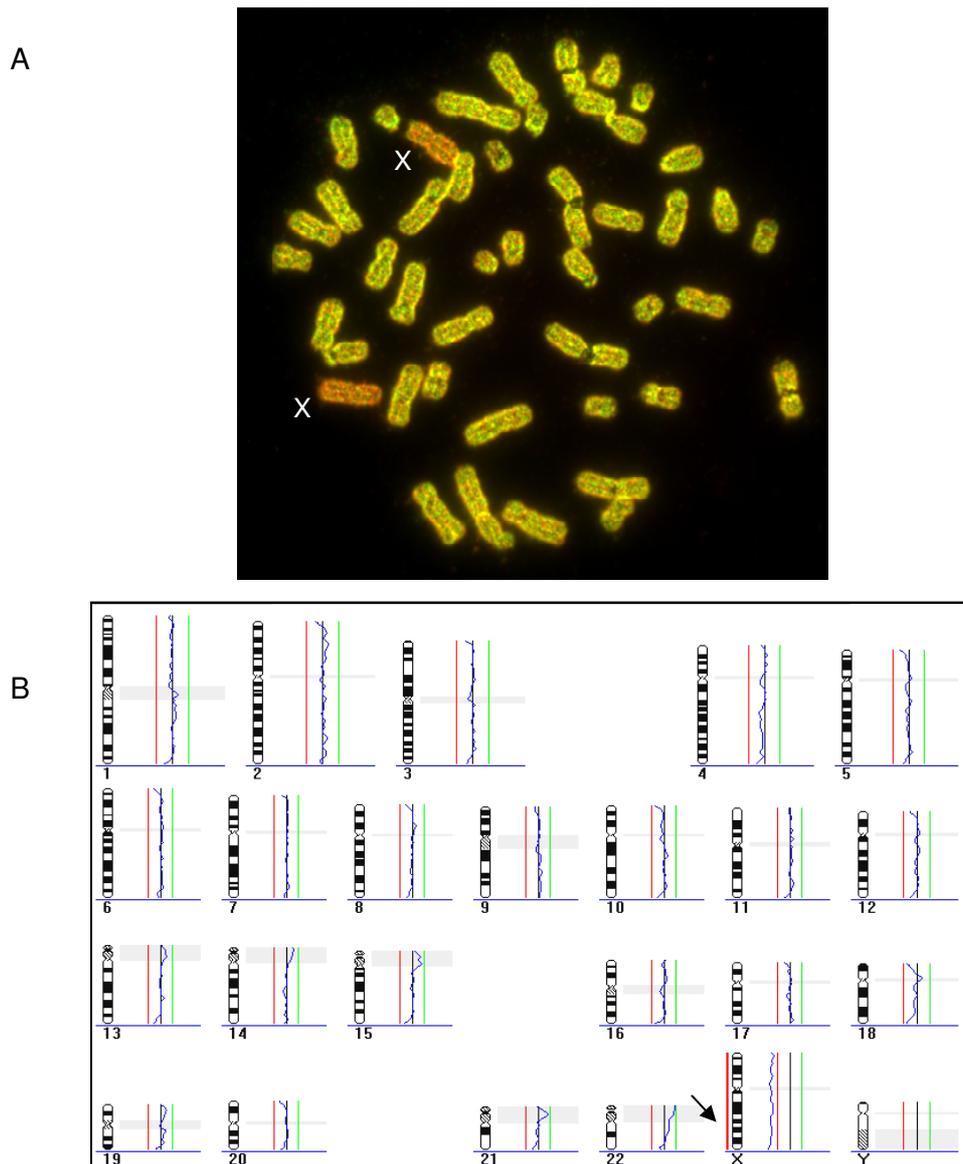
A: Überlagertes Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- und Texas-Rot (TR)-Bild einer Metaphase. B: Das Durchschnittsprofil wurde aus 5 Metaphasen berechnet und zeigt den für LCIS häufig typischen Zugewinn des langen Arms von Chromosom 1 und den Verlust von 16q (siehe Pfeile).

### 3.1.2 « *Multiple Strand Displacement Amplification* » (MDA)

Ebenso wie für die Genomamplifikation durch DOP- und Ligations-PCR wurde gezeigt, dass die „*Multiple Strand Displacement Amplification*“ mit 100 ng eingesetzter DNA aus Lymphozyten (XY versus XX) in Kombination mit Nick Translation zur DNA-Markierung sehr glatte CGH-Profile ergab und das Genom gleichmäßig amplifiziert wurde. Voraussetzung dafür war auch hier, dass die männliche und weibliche DNA gleichermaßen durch MDA amplifiziert wurden (siehe Abbildung 3.2).

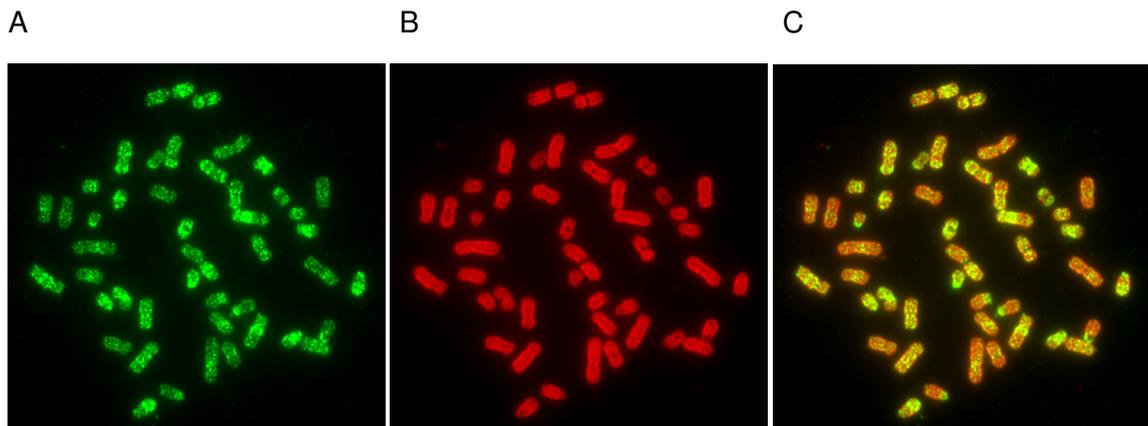
Neben der Nick Translation war es auch möglich, die männliche und weibliche Referenz-DNA während der MDA-Amplifikationsreaktion simultan in einem Reaktionsschritt zu markieren. Der Sexmismatch zeigte sich im CGH-Profil ähnlich deutlich wie in Abbildung 3.2. Allerdings traten bei einigen Chromosomen Veränderungen in den telomerischen Regionen auf und das Profil war insgesamt nicht so gleichmäßig. Während dieser simultanen Markierung war es unerheblich, ob Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP zusätzlich zu dem im Kit vorhandenen Nukleotid-Mix beigefügt oder ein selbst hergestellter Nukleotid-Mix verwendet wurde (siehe Kapitel 2.6.2).

Trotz der sehr guten Hybridisierungsergebnisse der DNA-Proben nach Anwendung der MDA-Amplifikationsmethode an nicht fixierter genomischer DNA war das gleiche Protokoll zur Genomamplifikation von isolierter DNA aus Gewebeschnitten von Paraffinmaterial nicht geeignet. Das Tumorgenom wurde im Vergleich zur Kontroll-DNA nur sehr inhomogen amplifiziert. Auch bei Tumor-DNA, die durch Proteinase K-Verdau aus lasermikrodissezierten Zellen aufgeschlossen wurde und direkt in die MDA-Reaktion eingesetzt wurde, konnte ebenfalls nur eine ungleichmäßige DNA-Anreicherung über das Genom beobachtet werden, während die weibliche Kontroll-DNA aus Lymphozyten sehr homogen amplifiziert wurde (siehe Abbildung 3.3). Für die Mikrodissektion wurde ein serieller Schnitt des gleichen Gewebeblocks wie für die durch Ligations-PCR amplifizierte Tumorprobe des in Abbildung 3.1 dargestellten LCIS, verwendet. Obwohl nach Hybridisierung der Tumor-DNA keine erhöhte Hintergrundfluoreszenz im FITC-Filter (Anregungswellenlänge 490 nm) beobachtet wurde, konnte auf Grund der ungleichmäßigen Amplifikation kein CGH-Profil erstellt werden. Außerdem war eine Überprüfung der DNA-Qualität auf einem Agarosegel vor der Hybridisierung nicht möglich, da alle aufgetragenen Proben, einschließlich der Leerkontrolle, die gleiche Fragmentlänge von 20 bis 40 kb aufwiesen. Diese Beobachtung wurde vom Hersteller des Kits bestätigt.



**Abbildung 3.2: Hybridisierung von männlicher versus weiblicher genomischer DNA nach DNA-Amplifikation durch MDA**

*Es wurde männliche und weibliche genomische DNA aus Lymphozyten durch MDA amplifiziert und anschließend mit Biotin-dUTP (XY-DNA, grün) und mit Digoxigenin-dUTP (XX-DNA, rot) durch Nick Translation markiert und beide gemeinsam auf normale weibliche Metaphasen hybridisiert. A: Überlagertes FITC- und TR-Bild einer Metaphase. B: CGH-Profil, berechnet aus 5 Metaphasen. Der Sexmismatch (Dosisverhältnis der X-Chromosomen von 2:1) wurde bei der Metaphase (rote X-Chromosomen) und im CGH-Profil (Verlust von Chromosom X) deutlich.*



**Abbildung 3.3: Hybridisierung von DNA eines LCIS nach Laser-Mikrodissektion und Amplifikation durch MDA**

Die Tumor- und Kontroll-DNA wurden durch MDA amplifiziert, mittels Nick Translation mit Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP markiert und beide zusammen auf eine normale weibliche Metaphase hybridisiert. A: ungleichmäßig amplifizierte Tumor-DNA (Probe 77-LCIS), B: Referenz-DNA, C: überlagertes FITC- und TR-Bild.

Von den oben aufgeführten Methoden zur DNA-Amplifikation aus Paraffinmaterial zeigte die Ligations-PCR die besten Resultate. Daher wurde sie in Kombination mit der Markierungs-PCR für alle CGH-Experimente an lasermikrodisseziertem Tumormaterial gewählt. In Tabelle 3.1 sind die wichtigsten Ergebnisse zur Genomamplifikation und DNA-Markierung für die konventionelle CGH zusammengefasst.

**Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Resultate der verschiedenen Amplifikations- und Markierungsmethoden in der konventionellen CGH**

Art der Amplifikation und DNA-Markierung	DNA aus Lymphozyten und Zelllinien	DNA aus Paraffinmaterial	
		Gewebeschnitte	nach LCM
DOP + NT (Bio/ Dig)	+++	++	*
DOP + M-PCR (Bio/ Dig)	+++	++	*
LIG + NT (Bio/ Dig)	+++	++	n.d.
LIG + M-PCR (Bio/ Dig od. SG/ SO)	+++	+++	+++
MDA + NT (Bio/ Dig)	+++	n.d.	n.d.
M-MDA (Bio/ Dig)	++	n.d.	*

Ergebnis: +++ sehr gut; ++ gut; + mäßig; \* nicht auswertbar; n.d. Analyse nicht durchgeführt

NT = Nick Translation, M-PCR = Markierungs-PCR, M-MDA = die Haptene zur DNA-Markierung wurden simultan zur MDA-Reaktion dazugegeben, LCM = Laser-Mikrodissektion.

## **3.2 Vergleich direkter DNA- Markierungsmethoden für Array-CGH-Untersuchungen**

Für die konventionelle CGH wurden das Genom aller laser-mikrodissezierten Tumorproben und die weibliche Kontroll-DNA durch Ligations-PCR amplifiziert und mittels Markierungs-PCR mit Biotin-dUTP und Digoxigenin-dUTP indirekt markiert. Eine indirekte DNA-Markierung für Hybridisierungen auf den sensitiveren DNA-Chips erwies sich als ungeeignet, da auf Grund unspezifischer Wechselwirkungen der Antikörper eine Hintergrundfluoreszenz verursacht wurde, die eine Auswertung der Experimente erschwert bzw. verhindert hätte. Zur Anwendung der Array-CGH-Technik war daher eine direkte Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin-3 für die Tumor-DNA und Cyanin-5 für die Kontroll-DNA vorgesehen. Weil es sich bei Cyanin-3 und Cyanin-5 um recht große Moleküle handelt, die sich meist schlecht in den DNA-Strang einbauen lassen, war es zunächst erforderlich, unterschiedliche Markierungsmethoden der durch Ligations-PCR amplifizierten Tumor-DNAs verschiedener Brustkrebsstadien aus Paraffinmaterial zu testen. Auf die Markierung durch Nick Translation wurde dabei verzichtet, weil die DNA-Fragmente nach der Ligations-PCR zum Einen mit etwa 300 bp schon verhältnismäßig kurz waren und zum Anderen durch die Nick Translation an nicht amplifizierter DNA aus Paraffinmaterial bereits keine optimalen CGH-Profile erzeugt wurden (siehe Kapitel 3.1.1). Daher wurden das Random Priming, das als Standardmethode zur DNA-Markierung für Chip-Hybridisierungen gilt, und zwei verschiedene Markierungs-PCRs ausgewählt und diese aus Kostengründen zunächst an Metaphasechromosomen (konventionelle CGH) und anschließend an DNA-Chips (Array-CGH) getestet.

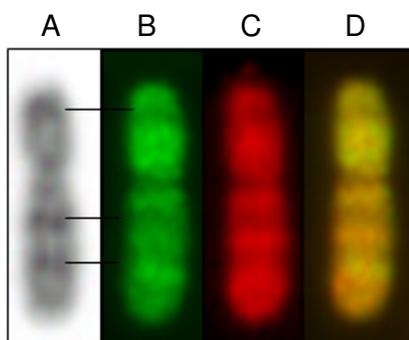
### **3.2.1 Direkte DNA-Markierung - Hybridisierung auf Metaphasen**

#### **3.2.1.1 DNA- Markierung durch Random Priming**

Als Standardmethode zur direkten DNA-Markierung für Array-CGH-Experimente wird in der Regel das Random Priming mit Cyanin-3 und Cyanin-5 gewählt. Allerdings wird für die Array-CGH meist genomische, nicht amplifizierte DNA aus frischen (unfixierten) Zellen oder kryokonserviertem Material verwendet und selten amplifizierte DNA aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Geweben.

Insgesamt hybridisierte nicht amplifizierte DNA aus Zelllinien und Lymphozyten (z. B. SKBR3-DNA versus XX-DNA), die durch Random Priming mit Cyanin-3 und Cyanin-5 markiert wurde, auf Metaphasen vergleichbar gut wie nach Standardmarkierung durch Nick Translation mit Biotin-dUTP und Digoxigenin-dUTP. Auch nach Präamplifikation durch Ligations-PCR vor dem Random Priming ließen sich sehr gleichmäßige CGH-Profile erzeugen, die alle bekannten Zugewinne und Verluste anzeigten. Auffällig war, dass nach direkter Markierung durch Random Priming immer ein spezifisches Bandenmuster auf den Chromosomen, entsprechend der G-Bänderung im DAPI-Bild auftrat. Dabei entsprachen die Banden mit den schwächeren Fluoreszenzintensitäten genau den dunklen AT-reichen chromosomalen Regionen. In den hellen genreichen

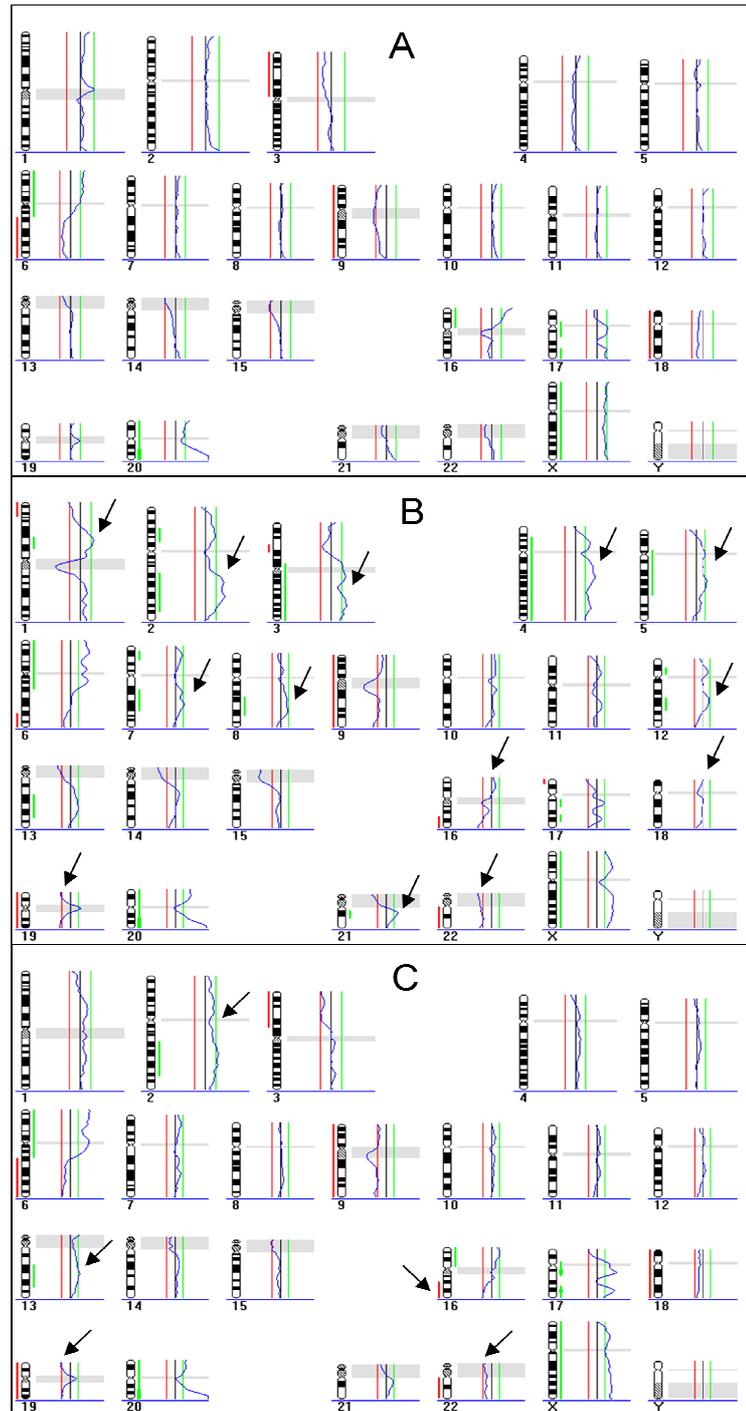
GC-Regionen hybridisierten die Sonden stärker. In Abbildung 3.4 ist dieses Muster am Beispiel von Chromosom 7 dargestellt. Die an dUTP oder an dCTP gekoppelten Cyanin-3- und Cyanin-5-Moleküle wurden in diesen Regionen besser in die DNA eingebaut. Da die intensitätsstarken und schwächeren Banden nach Hybridisierung sowohl im TRITC-Bild (Detektion Cyanin-3-markierter Tumor-DNA) als auch im Cy5-Bild (Detektion Cyanin-5-markierter Kontroll-DNA) identisch waren, hatte das Muster keine negativen Auswirkungen auf das Gesamtprofil (CGH-Profil nicht gezeigt). Kritische, die Hybridisierung beeinflussende Parameter, wie z. B. die Qualität der Metaphasenpräparate und deren Denaturierung oder das Blockieren unspezifischer Wechselwirkungen durch Cot 1-DNA konnten durch weitere Testhybridisierungen als Ursache für das Bandenmuster sicher ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.4: Bandenmuster nach Markierung durch Random Priming**

*Die SKBR3-DNA wurde mit Cyanin-3-dUTP und die Kontroll-DNA mit Cyanin-5-dUTP markiert und beide gemeinsam auf ein Metaphasenpräparat hybridisiert. Am Beispiel von Chromosom 7 sind die für das Random Priming typischen Banden entsprechend den AT- und GC-reichen Regionen auffallend. Die waagerechten schwarzen Linien im DAPI-Bild (A) markierten die dunklen AT-reichen Banden. In diesen Bereichen hybridisierte die DNA schwächer, was im TRITC- und Cy5-Kanal (B und C) und im überlagerten Bild (D) deutlich wird.*

Nachdem festgestellt wurde, dass sich das Random Priming zur direkten Markierung sowohl von nicht amplifizierter als auch durch Ligations-PCR amplifizierter Tumor-DNA der Zelllinie SKBR3 eignete, wurde die gleiche Methode an einer präamplifizierten Tumor-DNA aus Paraffinmaterial angewandt. Das CGH-Profil wurde mit dem bereits vorhandenen Profil nach Markierungs-PCR mit Biotin/Digoxigenin-dUTP zur Überprüfung der Qualität verglichen. Die Hybridisierung nach Random Priming-Markierung resultierte in einem heterogenen Gesamtprofil. Nicht alle bekannten Zugewinne und Verluste konnten klar detektiert werden (z. B. -6q und +16p), und es traten vermehrt falsch positive Zugewinne wie z. B. bei den Chromosomen 2q, 3q, 4 und 5 auf. Außerdem wurden häufig in den Telomerregionen artifizielle Schwankungen im Profil beobachtet (siehe Abbildung 3.5, Profil B).



**Abbildung 3.5: Vergleich von Methoden zur direkten DNA-Markierung nach Genomamplifikation durch Ligations-PCR**

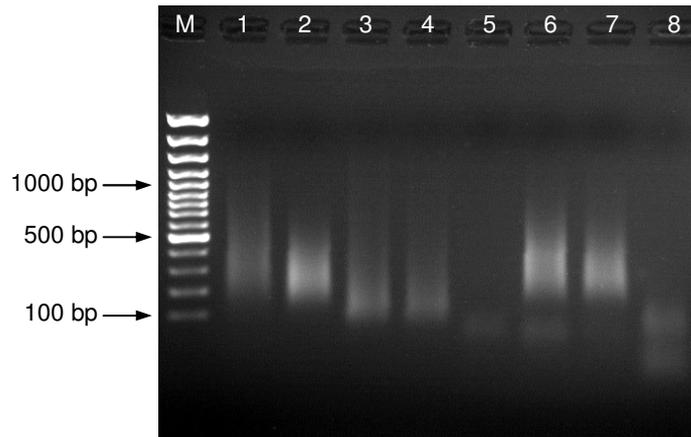
Die Tumor-DNA eines laser-mikrodissezierten DCIS (Probe 85) und weibliche Kontroll-DNA aus Lymphozyten wurden mittels Ligations-PCR amplifiziert und durch Markierungs-PCR mit Biotin-dUTP/Digoxigenin-dUTP als Standard markiert (A). Die gleichen Amplifikate wurden mit Cyanin-3-dUTP/Cyanin-5-dUTP durch Random Priming (B) und Markierungs-PCR mit dem Enzym Thermo Sequenase (C) markiert und die CGH-Profile miteinander verglichen. Nach Random Priming wurden vermehrt falsch positive Aberrationen detektiert, nach Markierungs-PCR nur vereinzelt (Artefakte durch Pfeile angezeigt). Die Gesamtprofile wurden jeweils aus fünf Metaphasen berechnet.

### 3.2.1.2 PCR-basierte DNA-Markierung

Nachdem es sich zeigte, dass mit amplifizierter DNA aus formalinfixiertem Gewebe, durch Random Priming markiert, im Vergleich zu unfixierter DNA aus Zelllinien oder Lymphozyten keine optimalen Hybridisierungsergebnisse auf Metaphasechromosomen erzielt werden konnten, wurde die Markierungs-PCR statt mit Biotin- und Digoxigenin-dUTP (siehe Kapitel 3.1.1) mit Cyanin-3 und Cyanin-5 in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Hier zeigte sich bereits mit präamplifizierter SKBR3-DNA, dass die Farbmoleküle während der Markierungsreaktion nicht ausreichend in die DNA inkorporiert wurden und besonders für Cyanin-5 keine ausreichenden Fluoreszenzintensitäten erreicht wurden. Des Weiteren wurde ein modifiziertes Protokoll der Markierungs-PCR mit dem Enzym Thermo Sequenase nach Klein *et al.* (1999) und Fuhrmann *et al.* (2008) getestet. Dieses Enzym ist in der Lage, große Moleküle wie Cyanin-3 und Cyanin-5 effizienter in die DNA einzubauen. Um die Effizienz zu erhöhen, wurden direkt an die Nukleotide (dUTP und dCTP) gebundene Farbstoffe eingesetzt. Mit präamplifizierter SKBR3-DNA wurden so vergleichbar gute Hybridisierungen und Profile gewonnen wie bei Standardmarkierung durch Nick Translation mit derselben, aber nicht amplifizierten DNA.

Unter Verwendung der bereits oben eingesetzten präamplifizierten Tumor-DNA der Probe 85-DCIS wurden im selben Hybridisierungsexperiment mittels PCR-Markierung mit Thermo Sequenase im Vergleich zum Random Priming deutlich gleichmäßigere CGH-Profile erzeugt (Abbildung 3.5, Profil B und C). Die Fluoreszenzintensitäten auf den Chromosomen waren bei gleicher Belichtungszeit nach Markierungs-PCR für Cyanin-3 durchschnittlich um 30 % und für Cyanin-5 um 40 % gegenüber dem Random Priming erhöht. Ein wie für das Random Priming beschriebene Bandenmuster (siehe Abbildung 3.4) wurde nicht beobachtet und im CGH-Profil wurden die meisten bekannten Zugewinne und Verluste richtig erkannt. Trotz einiger falsch positiver Zugewinne (+2q, +13q) und Verluste (-16q, -19, -22) war diese Art der DNA-Markierung dem Random Priming und auch der einfachen Markierungs-PCR deutlich überlegen.

Nach Auftragen der amplifizierten und markierten DNA-Proben auf ein 1 %-iges Agarosegel (siehe Abbildung 3.6) war zu erkennen, dass die Fragmente nach Random Priming (Bande 3 und 4) mit etwa 200 bp etwas kürzer waren als nach Markierungs-PCR (Bande 6 und 7). Die Produkte nach der Amplifikation durch Ligations-PCR (Bande 1 und 2) und Markierungs-PCR unter Verwendung des Enzyms Thermo Sequenase (Bande 6 und 7) waren mit zirka 300 bp ungefähr gleich lang.



**Abbildung 3.6: DNA-Fragmente nach Ligations-PCR und Markierung durch Random Priming und Markierungs-PCR**

Die DNA-Fragmente nach Ligations-PCR (Bande 1 und 2) und anschließender Markierungs-PCR (Bande 6 und 7) sind mit 300 bp etwa gleich lang, während sie nach Markierung durch Random Priming zirka 200 bp lang waren.

M = Längenstandard; 1 = weibliche Kontroll-DNA nach Ligations-PCR; 2 = DNA der Tumorprobe 85 nach Ligations-PCR; 3 = weibliche Kontroll-DNA nach Markierung durch Random Priming; 4 = Tumorprobe 85 nach Markierung durch Random Priming; 5 = Leerkontrolle nach RP; 6 = weibliche Kontroll-DNA nach Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase; 7 = Tumorprobe 85 nach Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase; 8 = Leerkontrolle nach Markierungs-PCR. Alle Proben wurden zur besseren Darstellung vor dem Auftragen über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt.

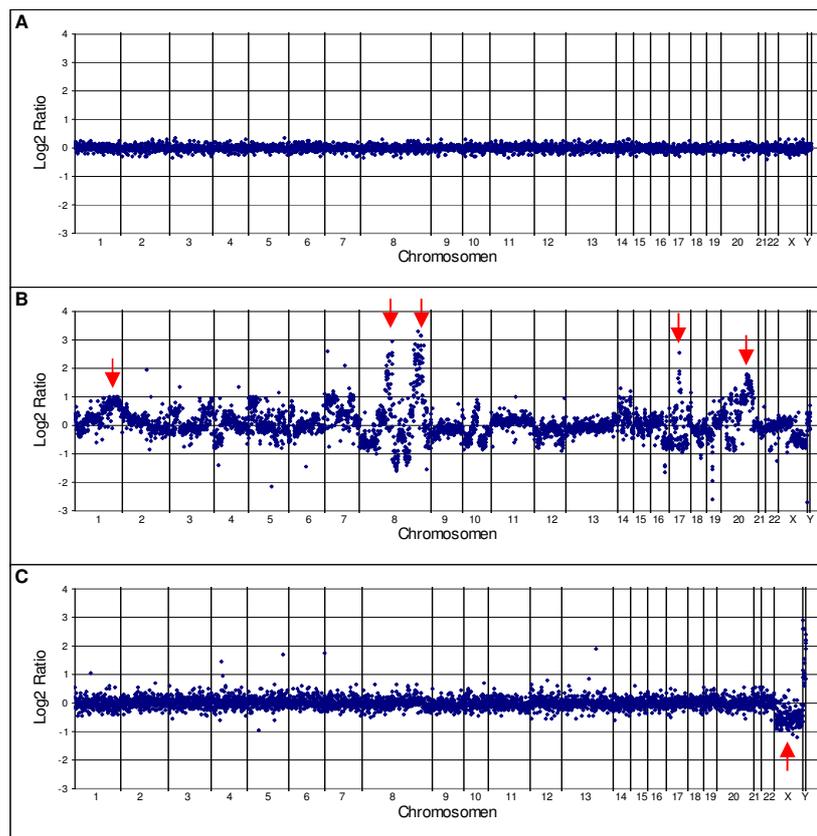
Für die Hybridisierung mit direkt markierten Sonden auf Metaphasen hat sich gezeigt, dass die DNA-Fällung ausreichend ist und es keiner zusätzlichen Säulen-Aufreinigung zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide bedarf. Beim Vergleich zwischen Random Priming und Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase an nicht fixierter DNA aus Lymphozyten und Zelllinien gab es keine nennenswerten Abweichungen der CGH-Profile. Beide Methoden waren gleichwertig. Beim Einsatz von DNA aus formalinfixiertem Gewebe war jedoch die Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase deutlich von Vorteil.

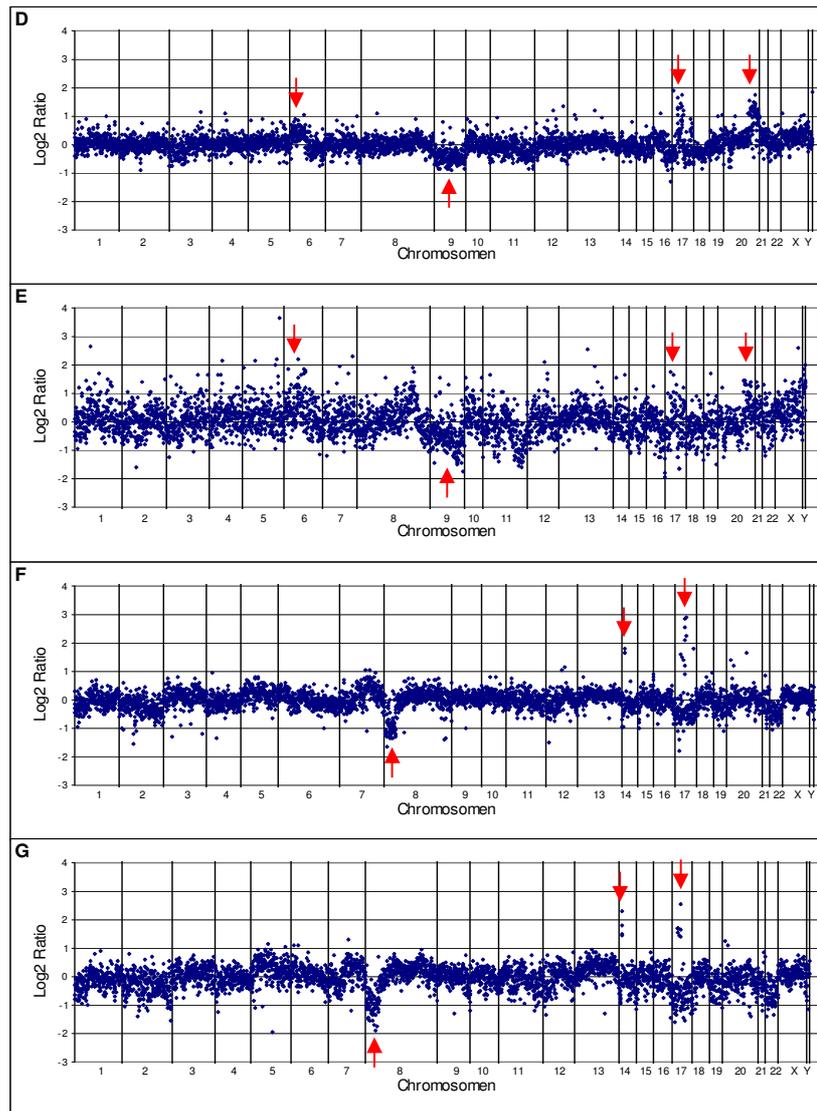
### 3.2.2 Vergleich von Random Priming und Markierungs-PCR - Hybridisierung auf DNA-Chips

Die aus den Hybridisierungen auf Metaphasechromosomen gewonnenen Erkenntnisse zur direkten DNA-Markierung mit Cyanin-3 und Cyanin-5 (siehe Kapitel 3.2.1) konnten im Wesentlichen auf die Array-CGH-Technik übertragen werden. Das Random Priming eignete sich sehr gut zur Markierung von frischer, nicht amplifizierter DNA bzw. amplifizierter genomischer DNA aus Lymphozyten und Zelllinien (siehe Abbildung 3.7, A und B), jedoch nicht zur Markierung von formalinfixierter Tumor-DNA, die durch Ligations-PCR präamplifiziert wurde. Bei Verwendung der bereits in

Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.5 auf Metaphasechromosomen eingesetzten DNA-Probe 85-DCIS traten nach Markierung durch Random Priming starke Streuungen der Log<sub>2</sub>-Ratio-Werte über das gesamte Genom auf (SD = 5,5). Außerdem wurden etwa 18 % aller auf dem Chip befindlichen DNA-Klone von der Analyse ausgeschlossen, so dass eine Bestimmung der Aberrationen nicht möglich war. Parallel zum Random Priming wurde die gleiche Tumorprobe im selben Hybridisierungsexperiment durch Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase markiert. Die Standardabweichung über das Genom war deutlich vermindert und auch die Anzahl der von der Analyse ausgeschlossenen Klone war um etwa ¼ reduziert (siehe Abbildung 3.7, D und E).

Um optimale Hybridisierungen auf dem relativ großen, fast den gesamten Objektträger einnehmenden Hybridisierungsareal (zirka 50 x 20 mm) zu ermöglichen, wurde zunächst ein Überschuss an markierter DNA eingesetzt. In der Regel wurden vier PCR- bzw. Random Priming-Reaktionen für die Tumor- und Referenz-DNA separat angesetzt und nach der Markierung miteinander vereinigt. In einem Vergleichsexperiment wurde festgestellt, dass auch zwei Reaktionsansätze mit je 100 ng Ausgangs-DNA für die Markierungs-PCR ausreichen, um vergleichbare Fluoreszenzintensitäten und ein CGH-Profil ohne Qualitätsverlust zu erhalten.





**Abbildung 3.7: Array-CGH-Profile unter Verwendung verschiedener Methoden zur DNA-Markierung**

*Hybridisierung nicht amplifizierter und amplifizierter Kontroll-DNAs (XX, XY und SKBR3) gegen normale weibliche Referenz-DNA nach Markierung durch Random Priming (A und B) und Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase (C) und Hybridisierung präamplifizierter DNA der Tumorproben 85-DCIS (D und E) und 86-DCIS (F und G) aus laser-mikrodisseziertem Gewebe auf DNA-Chips entsprechend der Tabelle 3.2.*

*Auf der X-Achse sind alle Chromosomen aufsteigend nach ihrer Mb-Position und auf der Y-Achse die Log<sub>2</sub>-Ratio-Werte der Fluoreszenzintensitäten nach Normalisierung und Hintergrundkorrektur aufgetragen. Die roten Pfeile kennzeichnen einige markante Änderungen der Kopienzahl der Tumore bzw. den „Sexmismatch“ von XY versus XX (C).*

Unter Einsatz von Cyanin-3 und Cyanin-5 in der Markierungs-PCR wurden Array-CGH-Profile mit einer weniger starken Streuung als beim Random Priming erzeugt. Zwar wurden Aberrationen wie z. B. der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 8 und die Amplifikation auf dem langen Arm von Chromosom 17 deutlich detektiert (siehe

Abbildung 3.7, F und G), jedoch war die Streuung der gemittelten Log2-Ratio-Werte für eine genauere Bestimmung der Aberrationen noch zu hoch. Somit war für präamplifizierte fixierte DNA aus Paraffinmaterial die Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase auch für die Anwendung der Array-CGH-Technik am besten geeignet (siehe Abbildung 3.7, D, E, F, G). Detaillierte Informationen zu den in Abbildung 3.7 hybridisierten Proben und den verwendeten DNA-Chips sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: Zusammenfassende Darstellung der in Abbildung 3.7 verwendeten DNA-Proben und DNA-Chips für die Array-CGH-Analyse**

Die Tabelle fasst wichtige Daten aus den in Abbildung 3.7 dargestellten Array-CGH-Profilen zusammen und gibt nähere Informationen zu den verwendeten DNA-Proben und deren Markierung sowie zu den verwendeten DNA-Chips.

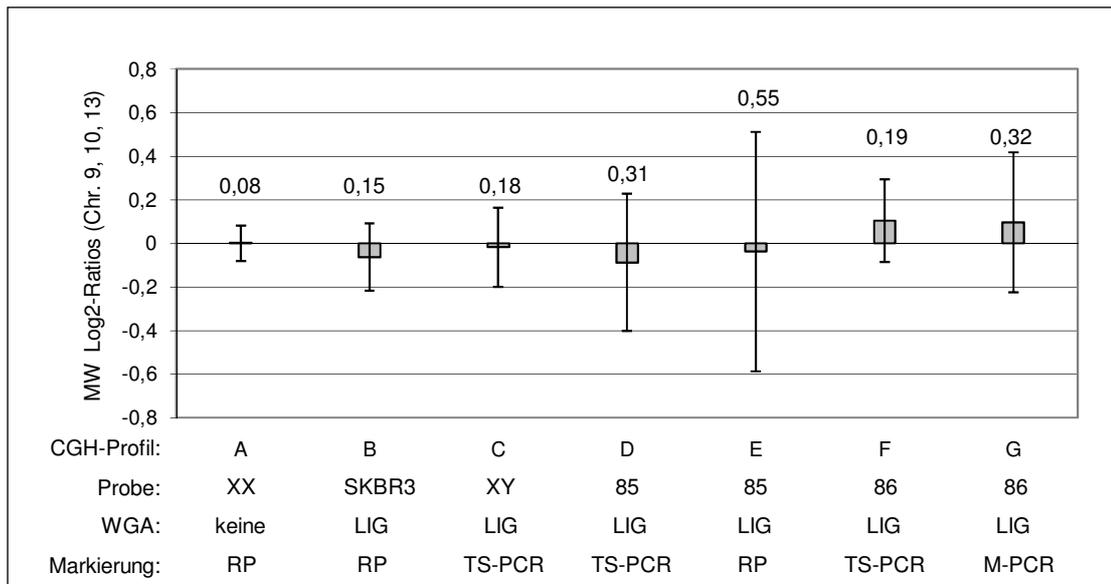
CGH-Profil	Probe	WGA	DNA-Markierung	Charge/Chip-Nr.	Anz. Klone gesamt (Mb)*	Anz. analysierter Klone (Mb)*	Flag [%]**	SD Genom***
A	XX	keine	RP	25/ 22	4670 (0,64)	4545 (0,67)	2,7	0,09
B	SKBR3	LIG	RP	23/ 57	4669 (0,64)	4441 (0,68)	4,9	0,60
C	XY	LIG	TS-PCR	25/ 81	4670 (0,64)	4365 (0,69)	6,5	0,21
D	85	LIG	TS-PCR	25/ 26	4670 (0,64)	4464 (0,67)	4,4	0,32
E	85	LIG	RP	25/ 99	4670 (0,64)	3836 (0,78)	17,9	0,55
F	86	LIG	TS-PCR	46/ 21	5804 (0,52)	4374 (0,52)	24,6	0,34
G	86	LIG	M-PCR	15/ 17	4649 (0,65)	4050 (0,74)	12,9	0,43

\* Die theoretische und reale Auflösung eines DNA-Chips in Mb (Zahlen in Klammern) ergibt sich ausgehend von der Größe des menschlichen Genoms von  $3 \times 10^9$  bp und der gesamten Anzahl aller auf dem jeweiligen Chip befindlichen Klone bzw. der Klone, die in die Berechnung eingeschlossen wurden. \*\* Prozentualer Anteil aller nicht analysierbaren BACs (Flag) nach den in Kapitel 2.11.7 beschriebenen Ausschlusskriterien; \*\*\* Standardabweichung (SD) aller Log2-Ratio-Werte über das gesamte Genom (außer Chromosom Y).

RP = Random Priming, M-PCR = Markierungs-PCR, TS-PCR = Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase, WGA = Art der Genomamplifikation, LIG = Ligations-PCR.

Zum Vergleich der unterschiedlichen Markierungsmethoden der in Abbildung 3.7 dargestellten Array-CGH-Profile und zur zusätzlichen Beurteilung der Hybridisierungsqualität wurden die Log2-Ratio-Werte ausgewählter, genetisch unveränderter Chromosomen (Chromosom 9, 10 und 13) gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt (siehe Abbildung 3.8). Um auch die hochaberrante Tumorzelllinie SKBR3 mit in die vergleichende Darstellung einzubeziehen, konnten bei

dieser Probe nur die unveränderten Chromosomenbanden 9p21.1-qter und Chromosom 13 mit einbezogen werden. Bereits nach Genomamplifikation der nicht fixierten Kontroll-DNAs (B und C) und unabhängig von der Markierungsmethode ist die Standardabweichung gegenüber der nicht fixierten und nicht amplifizierten Kontrolle (A) angestiegen. Durch die verminderte DNA-Qualität aus Paraffinmaterial sind die Standardabweichungen gegenüber DNA aus Lymphozyten oder Zelllinien zusätzlich erhöht (D bis G).



**Abbildung 3.8: Standardabweichungen unveränderter Chromosomen nach Anwendung unterschiedlicher Methoden zur DNA-Markierung**

Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen ausgewählter, unveränderter Chromosomen (Chr. 9, 10 und 13) der in Abbildung 3.7 bzw. Tabelle 3.2 verwendeten DNA-Proben mit Ausnahme der Tumorzelllinie SKBR3 (9p21.1-qter und Chr.13 unverändert). Die Berechnung erfolgte aus den Log<sub>2</sub> (Cy3:Cy5)-Intensitätsverhältnissen (Verhältnis für unveränderte Chromosomen = 2:2, Log<sub>2</sub> = 0). Die Werte oberhalb der Balken kennzeichnen die Standardabweichung.

In Tabelle 3.3 sind die wichtigsten der oben beschriebenen Hybridisierungsergebnisse auf Metaphasechromosomen und DNA-Chips, unter Verwendung von präamplifizierter DNA, die mit Cyanin-3 und Cyanin-5 direkt markiert wurde, zusammengefasst. Die Beschreibung der genetischen Aberrationen der für diese Testzwecke verwendeten Tumorproben 85 und 86 und ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der konventionellen- und Array-CGH erfolgen zusammen mit anderen ausgewählten DCIS in Kapitel 3.7.2 und sind im Anhang unter 9.4 aufgeführt.

**Tabelle 3.3: Beurteilung der Hybridisierungen auf Metaphasechromosomen und DNA-Chips unter Verwendung verschiedener Methoden zur direkten DNA-Markierung**

*Es wurde durch Ligations-PCR amplifizierte genomische DNA aus Lymphozyten oder Zelllinien und auf gleiche Weise amplifizierte Tumor-DNA aus Paraffinmaterial nach Laser-Mikrodissektion getestet. Alle DNA-Proben wurden mit Cyanin-3 bzw. Cyanin-5 direkt markiert.*

DNA-Markierung mit Cy3/Cy5 nach WGA	DNA aus Lymphozyten und Zelllinien		Fixierte DNA aus Paraffinmaterial nach LCM	
	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH
RP (Snijders <i>et al.</i> , 2001)	+++	+++	++	+
RP (De Vries <i>et al.</i> , 2005)	+++	n.d.	++	n.d.
M-PCR (Stoecklein <i>et al.</i> , 2002)	+	n.d.	+	++
TS-PCR (Klein <i>et al.</i> , 1999; Fuhrmann <i>et al.</i> , 2008)	+++	n.d.	+++	+++

*Ergebnis: +++ sehr gut; ++ gut; + mäßig; n.d. Analyse nicht durchgeführt*

*RP = Random Priming, M-PCR = Markierungs-PCR, TS-PCR = Markierungs-PCR mit Thermo Sequenase, LCM = Laser-Mikrodissektion, WGA = Amplifikation der genomischen DNA.*

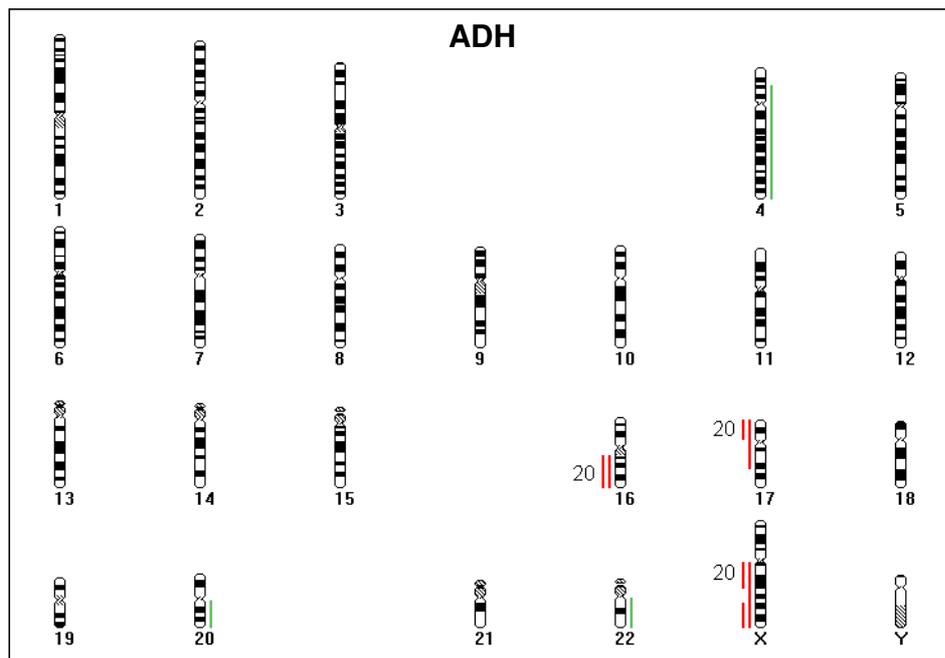
### 3.3 Konventionelle CGH-Analyse von Vorläuferläsionen und Karzinomen

Die CGH-Analyse früher Brustkrebsstadien erfordert eine exakte Isolierung der zu untersuchenden Tumorzellen mittels Laser-Mikrodissektion, damit die Ergebnisse nicht von angrenzenden normalen Epithelzellen oder vom umliegenden Bindegewebe beeinflusst werden. Wie die Voruntersuchungen in Kapitel 3.1 gezeigt haben, war es für die Anwendung der CGH-Technik am Paraffinmaterial von Vorteil, die gewonnene genomische DNA durch Ligations-PCR zu amplifizieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den CGH-Analysen der Vorläuferläsionen wie ADH, DCIS und LCIS sowie den Tumorregionen benachbarter normaler Epithelzellen beschrieben. Des Weiteren werden die CGH-Ergebnisse einiger autologer Gewebeproben (OP-Material einer Patientin) von DCIS- und LCIS-Patientinnen sowie einiger invasiven duktalem und lobulären Brusttumore (IDC und ILC) gezeigt.

#### 3.3.1 CGH-Analyse von atypisch duktalem Hyperplasien (ADH)

Die CGH-Analysen wurden an elf laser-mikrodissezierten Gewebeproben von zehn Patientinnen mit einer ADH durchgeführt. Bei den Proben von fünf Patientinnen (51, 58-2, 65, 106 und 112) wurden Aberrationen detektiert, während die Profile der verbleibenden fünf Patientinnen, darunter eine Patientin mit zwei analysierten

Gewebeproben, unauffällig waren. Die wenigen Veränderungen traten meist vereinzelt und auf verschiedenen Chromosomen auf (siehe Abbildung 3.9). Regionen mit einer Amplifikation oder homozygoten Deletionen wurden nicht gefunden und es wurden maximal drei Aberrationen pro Tumor (Probe 58-2) detektiert. Bei dieser Patientin wurde in einer zweiten Gewebeprobe außerdem ein schlecht differenziertes DCIS (Probe 58-1) mit einer mikroinvasiven Komponente diagnostiziert, in welcher insgesamt fünf Aberrationen nachgewiesen wurden. Bei den anderen ADH-Proben gab es keine Hinweise für Malignität. Insgesamt wurden alle bei den ADH aufgetretenen chromosomalen Veränderungen bei den DCIS mit einer höheren Frequenz wieder gefunden.



**Abbildung 3.9: Zusammenfassende CGH-Ergebnisse aller Proben mit einer ADH**

In der Abbildung sind alle genetischen Veränderungen von zehn Patientinnen mit einer ADH (11 analysierte Proben) zusammengefasst. Zweimal wurden chromosomale Verluste auf 16q, Chr. 17 und Xq gefunden sowie einmal Zugewinne genetischen Materials auf Chr. 4, 20q und Chr. 22. Die roten Balken links der Chromosomen repräsentieren Verluste genetischen Materials und die grünen Linien rechts Zugewinne chromosomalen Materials. Die Zahlen neben den Balken geben die Frequenz der Aberrationen in Prozent an und beziehen sich auf die Anzahl der Patientinnen. Aberrationen mit einer Häufigkeit von < 20 % wurden nicht berücksichtigt.

### 3.3.2 CGH-Analyse von duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) mit unterschiedlicher Differenzierung

Die Untersuchung von 23 Patientinnen mit einem DCIS (insgesamt 29 analysierte Gewebeproben) ergab bei allen Patientinnen ein genetisch aberrantes Profil. Bei einer Tumorprobe (95-1) wurden keine Veränderungen nachgewiesen. In einer zweiten Probe der gleichen Patientin (95-2) wurden 13 Aberrationen detektiert. Die genetischen

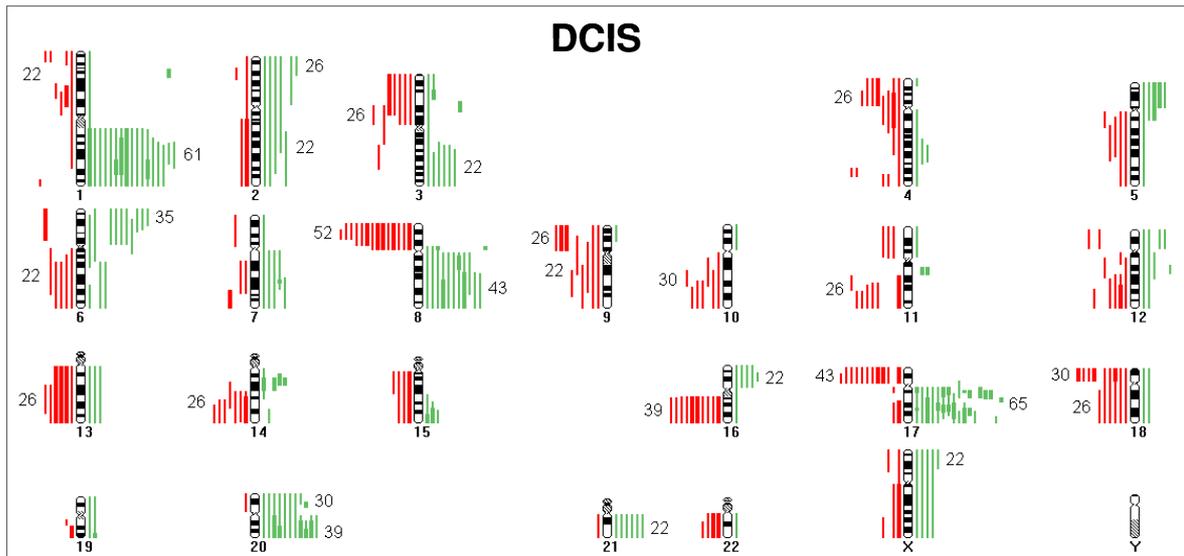
Veränderungen aller DCIS-Proben sind in Abbildung 3.10 zusammengefasst. Es wurde ein Median-Wert von acht Aberrationen pro Patientin detektiert und meist waren mehrere Chromosomen betroffen. Die Spanne lag zwischen 2 bis 23 Aberrationen pro Tumor. Häufige genetische Veränderungen in Form von chromosomalen Zugewinnen wurden auf den Chromosomenarmen 17q (65 %), 1q (61 %), 8q (43 %), 20q (39 %) und 6p (35 %) beobachtet und chromosomale Verluste auf den Chromosomenarmen 8p (52 %), 17p (43 %) und 16q (39 %). Bei den Proben von 13 Patientinnen (57 %) waren eine oder mehrere chromosomale Regionen amplifiziert und bei acht Patientinnen (35 %) gab es Regionen, in denen beide Kopien deletiert waren. In Tabelle 3.4 sind die Chromosomenarme aufgeführt, in denen wiederholt Amplifikationen und homozygote Deletionen auftraten.

**Tabelle 3.4: Häufige Regionen mit Amplifikationen und homozygoten Deletionen bei DCIS**

*Veränderungen mit einer Frequenz von < 9 % wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt.*

Amplifikationen bei DCIS		Homozygote Deletionen bei DCIS	
Region	Frequenz	Region	Frequenz
17q	43 % (10/ 23)	8p	17 % (4/ 23)
20q	26 % (6/ 23)	13q, 16q, 17p	13 % (3/ 23)
1q	17 % (4/ 23)	4p, 9p, 18p, 22q	9 % (2/ 23)
14q12-q21	13 % (3/ 23)		
3p, 5p, 8q, 11q13, 15q24-qter	9 % (2/ 23)		

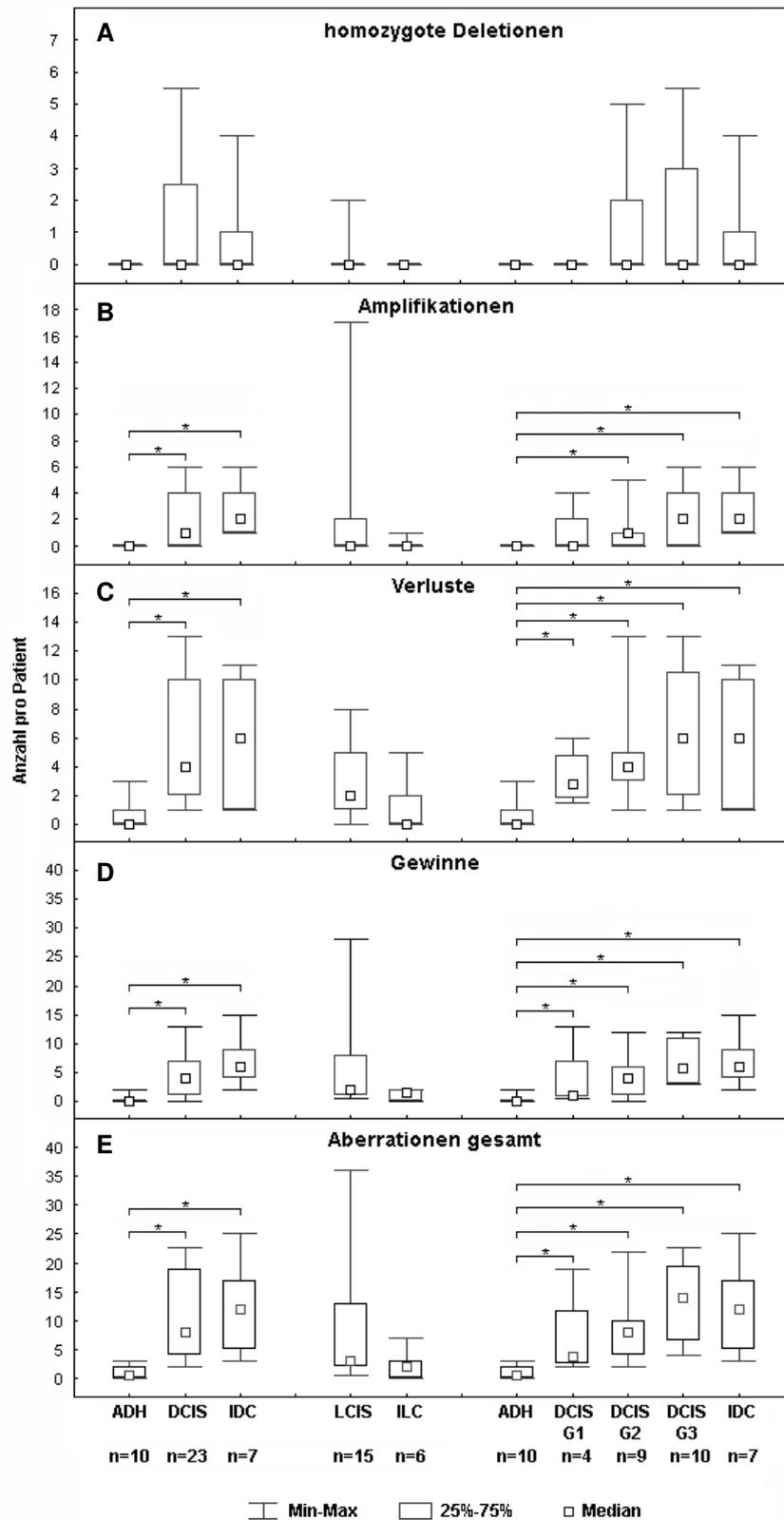
Auf dem langen Arm von Chromosom 17 wurden mehrfach zwei Amplifikationspeaks auf den Banden 17q11.1-q21 und/ oder 17q22-q24 (einschließlich der *HER-2-neu*-Region) gefunden. Vereinzelt traten Amplifikationen z. B. auf den Chromosomenarmen 7q und 19q auf. Maximal wurden sechs Amplifikationen pro Tumor (Probe 52 und 88-2, beides DCIS mit Kerngrad 3) nachgewiesen. Die Amplifikationen traten meist in Regionen auf, die auch bei anderen Proben zumindest in einer Kopie gewonnen waren. Homozygote Deletionen wurden ebenfalls in Abschnitten beobachtet, die bei anderen Proben häufig auch in einer Kopie verloren waren. Bei Tumorprobe 54-2, einem DCIS mit Grad 3, waren elf verschiedene Regionen in beiden Kopien deletiert, häufig ein ganzer Chromosomenarm, wie z. B. 8p.



**Abbildung 3.10: Zusammenfassende CGH-Ergebnisse aller Proben mit einem DCIS**

CGH-Analyse von 23 Patientinnen mit einem DCIS (insgesamt 29 analysierte Proben). Die DCIS-Proben weisen meist sehr komplexe Aberrationen auf. Besonders häufig waren chromosomale Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q, 6p, 8q, 17q und 20q sowie chromosomale Verluste auf 8p, 16q, 17p und 18p. Rote Balken links der Chromosomen: chromosomale Verluste; grüne Linien rechts: chromosomale Zugewinne; dicke grüne und rote Balken: Amplifikationen bzw. homozygote Deletionen. Die Zahlen neben den Balken geben die Frequenz der Aberrationen, differenziert für den p- und q-Arm, in Prozent an und beziehen sich auf die Anzahl der Patientinnen. Aberrationen mit einer Häufigkeit von < 20 % wurden nicht mit einbezogen.

Die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen steigt von den ADH zu den DCIS sprunghaft an (Median-Wert ADH: 0,5 und Median-Wert DCIS: 8). Signifikante Unterschiede wurden bereits zwischen den ADH und den DCIS mit Kerngrad 1 ( $p = 0,016$ ) und hoch signifikante Unterschiede ( $p = 0,0002$ ) zwischen den ADH und den DCIS Grad 3 gefunden. Innerhalb der Gruppe der DCIS nimmt die Anzahl an Aberrationen mit zunehmendem Kerngrad weiter zu, erreicht allerdings nicht die Schwelle zur Signifikanz (DCIS Grad 1 versus Grad 3,  $p = 0,077$ ). Ähnlich verhält es sich mit der Anzahl von chromosomalen Zugewinnen und chromosomalen Verlusten. Bezüglich der Anzahl an homozygoten Deletionen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorgruppen festgestellt (siehe Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Anzahl von Aberrationen verschiedener Tumorgruppen**

Die Gesamtzahl an Aberrationen pro Patientin und deren Unterteilung in Zugewinne, Verluste, Amplifikationen und homozygote Deletionen sind für die analysierten Tumorgruppen als Boxplots (Median, 25 %- und 75 %-Quantile, minimaler und maximaler Wert) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test;  $p \leq 0,05$ ) zwischen zwei Tumorentitäten sind mit einer Klammer und einem Stern (\*) gekennzeichnet.

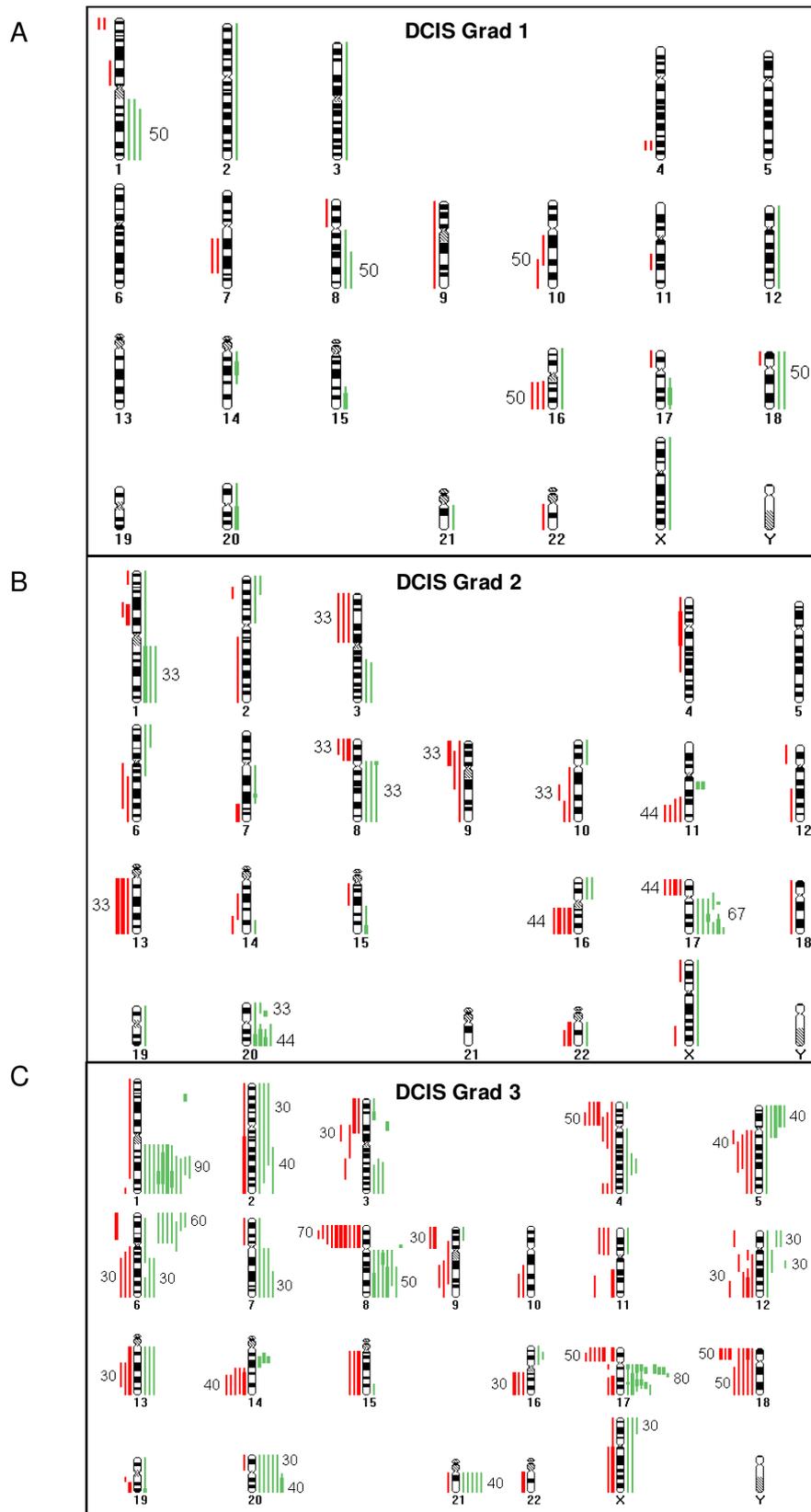
Am häufigsten waren bei den DCIS mit Kerngrad 1 Zugewinne der Chromosomenarme 1q und 8q und des gesamten Chromosoms 18 sowie Verluste auf 16q. Meist waren nur wenige Chromosomenabschnitte einer Probe aberrant. Eine Ausnahme bildete die Tumorprobe 84, bei der insgesamt 19 Aberrationen, darunter 4 Amplifikationen auf den Chromosomenbanden 14q, 15q, 17q und 20q, beobachtet wurden. Bei den anderen Grad 1-Tumoren traten keine Amplifikationen auf (siehe Abbildung 3.12, A).

Die DCIS mit Kerngrad 2 wiesen zusätzlich häufig Zugewinne und Verluste auf den Chromosomenabschnitten -3p, -8p, -9p, -11q, -13q, -16q, +17q, +20 auf. Bei den Proben von fünf Patientinnen (56 %) wurden Amplifikationen und bei denen von vier Patientinnen (44 %) homozygote Deletionen gefunden (siehe Abbildung 3.12, B). Eine Amplifikation der Chromosomenbande 11q13 trat bei den Proben von zwei Patientinnen auf (58-1 und 63).

Schlecht differenzierte DCIS mit Kerngrad 3 hatten meist eine Vielzahl genetischer Veränderungen. Aberrationen wurden auf allen Chromosomen mit unterschiedlicher Frequenz nachgewiesen (siehe Abbildung 3.12, C). Bei sieben von zehn Patientinnen (70 %) traten Amplifikationen und bei 5 Patientinnen (50 %) eine oder mehrere homozygote Deletionen auf. Eine Amplifikation in der Region 14q12-q21 wurde bei drei Patientinnen (Probe 49, 52, 54-2) beobachtet und zusätzlich bei der oben beschriebenen Tumorprobe 84, einem DCIS mit Kerngrad 1. Im Vergleich zu den DCIS Grad 2 war generell eine zunehmende Frequenz an Veränderungen, insbesondere der Chromosomenabschnitte 1q, 4p, 5p und 5q, 6p, 7q, 8p und 8q, 12p und 12q, 14q12-q21, 17p und 17q, 18p und 18q sowie 21q zu sehen. Die Aberrationsfrequenz der Chromosomenabschnitte 3p und des Chromosoms 20 war ähnlich.

Häufig werden bei den intraduktalen Karzinomen im histologischen Schnittpräparat Nekrosen beobachtet, die von prognostischer Bedeutung sind (siehe Van-Nuys Klassifikation (siehe Abschnitt 1.1.2.2)). Tumore mit Kerngrad 1 weisen per Definition keine Nekrosen auf. In nahezu allen Gewebeschnitten der untersuchten Grad 3 Tumore wurden nekrotische Anteile beobachtet. Daher wurde die Gruppe der DCIS mit Kerngrad 2 in Tumore mit und ohne Nekrosen unterteilt und die Anzahl an Aberrationen miteinander verglichen. Bei 3 Patientinnen wurden keine Nekrosen und bei 6 Patientinnen Nekrosen im Schnittpräparat diagnostiziert. Der Median-Wert an Aberrationen betrug im Kollektiv ohne Nekrosen 2 (Spanne 2 bis 9) und in der Gruppe mit Nekrosen 9 (Spanne 4 bis 22). Auf Grund der geringen Patientenzahl in der Gruppe ohne Nekrosen, waren die Unterschiede nicht signifikant ( $p = 0,12$ ).

Des Weiteren wurden in den Gewebeschnitten von 5 Patientinnen mit einem DCIS einige Zellen mit mikroinvasivem Wachstum beobachtet. Diese Tumorproben wiesen im Vergleich zu den anderen DCIS keine erhöhte Anzahl an Aberrationen auf und auch die Anzahl an Amplifikationen oder homozygoten Deletionen war nicht erhöht.

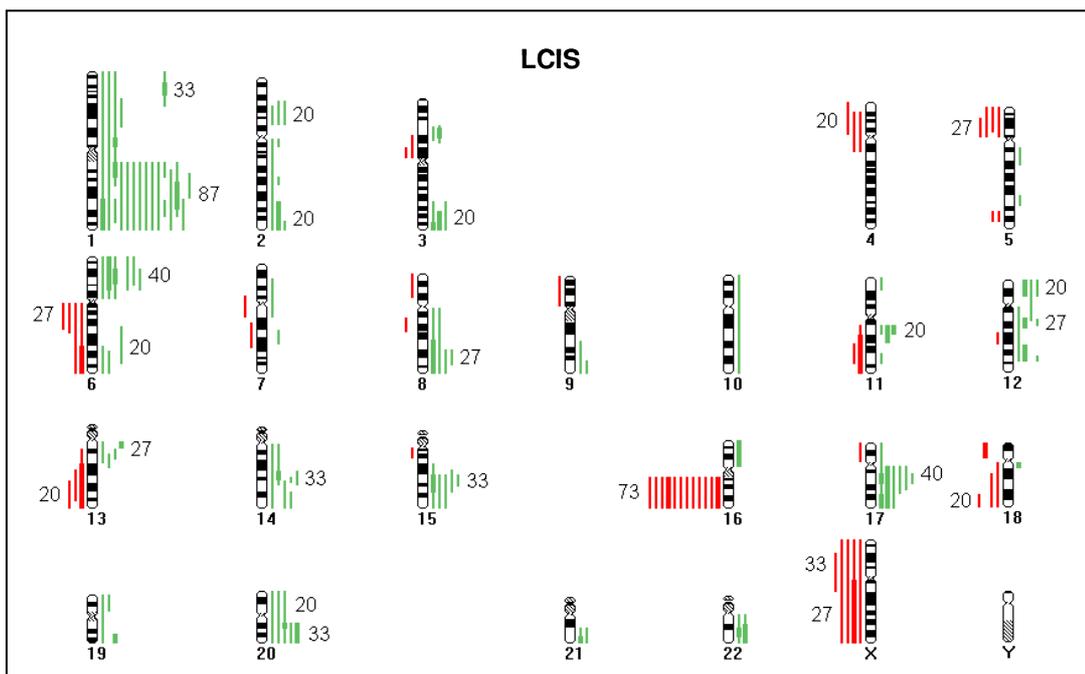


**Abbildung 3.12: CGH-Ergebnisse aller DCIS differenziert nach Kerngrad**

Die Abbildung zeigt die genetischen Veränderungen aller in Abbildung 3.10 dargestellten DCIS-Proben, differenziert nach Kerngrad 1 ( $n = 6$ ), Grad 2 ( $n = 9$ ) und Grad 3 ( $n = 14$ ). Rote Balken links der Ideogramme: chromosomale Verluste; dicke rote Balken: homozygote Deletionen; grüne Linien rechts: chromosomale Zugewinne und dicke grüne Balken: Amplifikationen.

### 3.3.3 CGH-Analyse von lobulären Carcinoma *in situ* (LCIS)

In der Gruppe der LCIS wurden 19 Tumorproben von 15 Patientinnen analysiert und im Median drei Aberrationen pro Patientin detektiert. Im Vergleich zu den DCIS war die Anzahl nicht signifikant verschieden ( $p = 0,15$ ), aber bezüglich der Anzahl an Verlusten wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Tumorgruppen gefunden ( $p = 0,03$ ) (siehe Abbildung 3.11). Die häufigsten Aberrationen betrafen die Chromosomen 1 und 16 (siehe Abbildung 3.13). Das simultane Auftreten eines Zugewinns des langen Arms von Chromosom 1 und ein Verlust des langen Arms von Chromosom 16 wurde bei 67 % der Patientinnen (10 von 15 Patientinnen) nachgewiesen, während es bei den Patientinnen mit einem DCIS 26 % (6 von 23 Patientinnen) waren. Weitere genetische Veränderungen traten auf den Chromosomenabschnitten 6p und 6q, 8q, 12q, 14q, 15q, 17q, 20q und auf Chromosom X auf. Das Auftreten amplifizierter Regionen wurden bei den LCIS mit einer Häufigkeit von 40 % (6 Patientinnen) und das Vorliegen von homozygoten Deletionen mit einer Frequenz von 33 % (5 Patientinnen) nachgewiesen. Bevorzugte Regionen für Amplifikationen waren auf den Chromosomenarmen 1q, 6q, 11q, 20q und 22q lokalisiert.



**Abbildung 3.13: Zusammenfassende CGH-Ergebnisse aller Proben mit einem LCIS**

Das Histogramm zeigt alle Aberrationen von insgesamt 19 Tumorproben der 15 Patientinnen mit einem LCIS. Von vier Patientinnen wurde Gewebe aus zwei verschiedenen Paraffinblöcken analysiert. Neben den bei LCIS am häufigsten beobachteten chromosomalen Zugewinnen auf 1q und Verlusten auf 16q wurden wiederholt weitere genetische Veränderungen auf den Chromosomenarmen 6p, 15q, 17q, 20q, Xp und Xq detektiert. Die Zahlen neben den Farbbalken entsprechen der Aberrationsfrequenz in Prozent. Weniger als drei Aberrationen pro Chromosomenarm (20 %) wurden nicht berechnet. Rote Balken links der Chromosomen: chromosomale Verluste; dicke rote Balken: homozygote Deletionen; grüne Balken rechts der Ideogramme: chromosomale Zugewinne, dicke grüne Balken: Amplifikationen.

### 3.3.4 CGH-Analyse autologer Gewebeproben

Von insgesamt elf Patientinnen, bei denen eine ADH, ein DCIS oder ein LCIS bzw. eine ALH diagnostiziert wurde, wurden jeweils zwei Gewebeproben aus dem gleichen OP-Material (autolog) mittels CGH analysiert. Die Tumorproben wurden in Formalin fixiert und in zwei separaten Paraffinblöcken eingebettet. Tabelle 3.5 zeigt die Anzahl der genetischen Veränderungen der elf autologen Tumorkopiepaare und die prozentuale Übereinstimmung gemeinsamer Aberrationen, berechnet nach Waldman *et al.* (2000). Der Median der prozentualen Übereinstimmung aller Paare betrug 50 % (Bereich 0 bis 100 %). Bei drei Patientinnen (72, 95 und 104) wurden zwischen den autologen Gewebeproben keine gemeinsamen genetischen Veränderungen beobachtet, da jeweils eine Gewebeprobe gar keine Aberrationen aufwies. Bei zehn Patientinnen waren beide analysierten Proben vom gleichen Tumortyp und das Kerngrading der Patientinnen mit einem DCIS identisch. Bei einer Patientin (Probe 58) wurde das Gewebe aus Paraffinblock 1 als ein DCIS und das des zweiten Blocks als eine ADH diagnostiziert. Die Aberrationen des hoch differenzierten DCIS- und des ADH-Anteils dieser Patientin stimmten zu 50 % überein. Gemeinsame Veränderungen wurden in Form von Verlusten auf den Chromosomenarmen 16q und Xq gefunden.

**Tabelle 3.5: Prozentuale Übereinstimmung von Aberrationen in autologen Tumorproben**

*Aufgelistet ist die Anzahl an Aberrationen in jeweils zwei Gewebeproben einer Patientin sowie die Anzahl gemeinsamer Veränderungen beider Proben. Die Berechnung der prozentualen Übereinstimmung zwischen den Aberrationen der Proben aus Paraffinblock 1 und 2 erfolgte nach Waldman *et al.* (2000), siehe Kapitel 2.13. Hinter den mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Proben wurden Zugewinne und Verluste chromosomaler Regionen in Form von Amplifikationen und/ oder Deletionen gefunden.*

Diagnose (Patienten-ID)	Aberrationen Block 1	Aberrationen Block 2	gemeinsame Aberrationen	Übereinstimmung [%]
DCIS-G1 (79-1/ 79-2)	2	2	1	50
DCIS-G1 (99-1/ 99-2)	5	4	4	89
DCIS-G3 (42-1/ 42-2)	5	9	4	61
DCIS-G3 (54-1/ 54-2)*	21	18	14	72
DCIS-G3 (88-1/ 88-2)*	23	22	16	71
DCIS-G3 (95-1/ 95-2)	0	13	0	0
DCIS-G3 (58-1)/ ADH (58-2)	5	3	2	50
LCIS (72-1/ 72-2)	2	0	0	0
LCIS (73-1/ 73-2)*	2	17	1	11
LCIS (74-1/ 74-2)	2	2	2	100
LCIS (104-1/ 104-2)	1	0	0	0

Interessant war es festzustellen, ob chromosomale Regionen mit Zugewinnen oder Verlusten von mehreren Kopien (Amplifikationen und Deletionen) in einem Anteil auch in der anderen Gewebeprobe mindestens einen Zugewinn oder Verlust zeigten. Trat in einer Probe eine Amplifikation oder Deletion auf und in der anderen Probe in der gleichen Region ein Zugewinn oder Verlust einer Kopie, wurde dies als Übereinstimmung gewertet. Für drei Patientinnen (Probe 54, 73 und 88) ergab sich eine Übereinstimmung von 91 %, 50 % und 88 % (Median 88 %).

### 3.3.5 CGH-Ergebnisse von normalem Brustepithel

Von 12 Patientinnen (13 analysierte Proben) wurden nicht nur Tumorzellen, sondern auch an den Tumor angrenzende normale Epithelzellen desselben Schnittpräparates laser-mikrodisseziert und mittels CGH-Technik analysiert. Bei sechs Patientenproben grenzten die normalen Zellen an ein LCIS, bei drei Proben grenzten sie an ein DCIS (2x DCIS Grad 3 und 1x DCIS Grad 1) und bei vier Proben an eine ADH. Zusammen mit der Tumor-DNA wurde die DNA aus den als normal klassifizierten Zellen durch Ligations-PCR vervielfältigt und anschließend in jeder Hybridisierungsrunde einige der Kontrollproben mitgeführt und ausgewertet. Da die Unterscheidung zwischen hyperplastischen Zellen und normalem Gewebe schwierig ist, wurden die Gebiete mit normalen Epithelzellen von einem erfahrenen Pathologen im Schnittpräparat eingezeichnet.

Bei zwei Patientinnen zeigten die als normal eingestuftes Gewebeprobe Aberrationen im CGH-Profil. Die Proben der anderen Patientinnen waren genetisch unverändert. Um das Ergebnis der beiden Proben zu überprüfen und um mögliche Kontaminationen durch angrenzende Tumorzellen auszuschließen, wurden die CGH-Analysen, einschließlich der Laser-Mikrodissektion und DNA-Amplifikation, von neu angefertigten Schnittpräparaten komplett wiederholt. Das Vorhandensein von Aberrationen konnte in beiden Fällen bestätigt werden.

Im ersten Fall handelt es sich um Normalgewebe, das an ein schlecht differenziertes DCIS (Probe 90) angrenzte, in dem keine mikroinvasiven Tumorzellen nachgewiesen wurden. Die CGH-Profile des als histologisch normal eingestuftes Gewebes (90-N) und des Tumors waren hoch aberrant und zeigten recht ähnliche Muster. Markante Zugewinne, einschließlich der Amplifikationen wie z. B. auf den Chromosomenarmen 1q, 8q und 17q, wurden auch beim normalen Gewebe gefunden (siehe Abbildung 3.14, A). Die Aberrationen stimmten zu 59 % überein (siehe Tabelle 3.6).

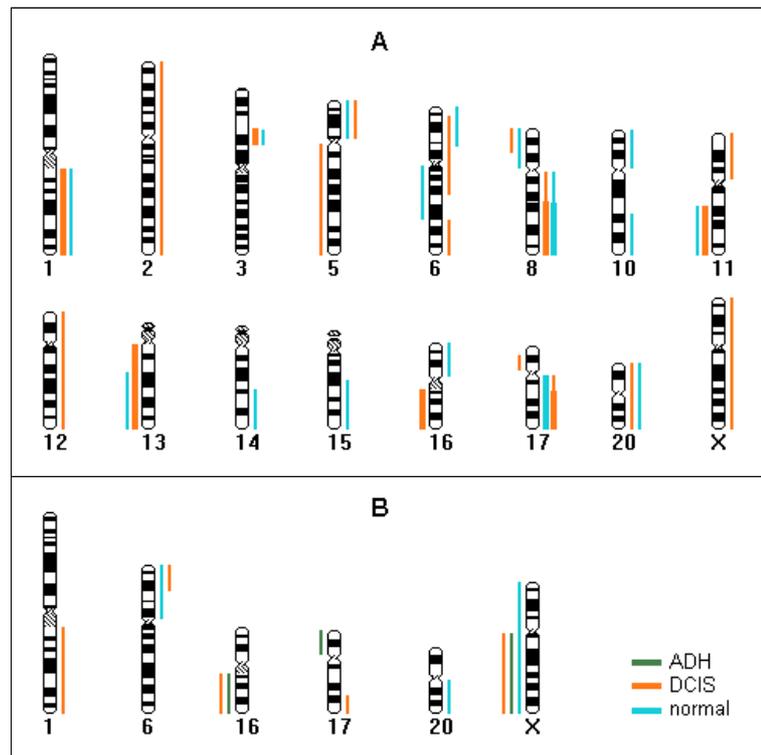
Bei der zweiten Patientin befand sich das histologisch normale Gewebe in der unmittelbaren Umgebung einer ADH (Probe 58-2). Zusätzlich lag in einem weiteren Paraffinblock des gleichen OP-Materials Gewebe eines schlecht differenzierten DCIS (Probe 58-1) mit einer mikroinvasiven Komponente vor (siehe Tabelle 3.5). Obwohl sich die Zellen der ADH im selben Schnittpräparat wie die histologisch normalen Epithelzellen (58-2-N) befanden, stimmten die Aberrationen aus dem Dissektat der normalen Zellen besser mit der DCIS-Komponente überein (siehe Tabelle 3.6). Wie in

Kapitel 3.3.1 erwähnt, wurde bei der ADH-Probe die maximale Zahl an Aberrationen unter den ADH gefunden. Eine gemeinsame Veränderung, die bei allen drei Gewebeproben auftrat, war der Verlust des langen Arms von Chromosom X (siehe Abbildung 3.14, B).

**Tabelle 3.6: Prozentuale Übereinstimmung von Aberrationen im Tumor und angrenzendem normalen Epithel**

*Dargestellt ist die Anzahl an Aberrationen im Tumor und der angrenzender normaler Epithelzellen im gleichen Gewebeschnitt sowie die Anzahl der gemeinsamen Veränderungen. Die Berechnung der prozentualen Übereinstimmung gemeinsamer Aberrationen erfolgte nach Waldman et al. (2000), siehe Kapitel 2.13. Mit einem Stern (\*) wurden Gewebeproben der gleichen Patientin gekennzeichnet, die in zwei verschiedenen Paraffinblöcken eingebettet wurden. Die normalen Epithelzellen wurden hier angrenzend zur ADH, also aus Block 2 gewonnen.*

<b>Diagnose (Patienten-ID)</b>	<b>Aberrationen Tumor</b>	<b>Aberrationen normale Zellen</b>	<b>gemeinsame Aberrationen</b>	<b>Übereinstimmung [%]</b>
DCIS-G3 (90/ 90-N)	18	16	10	59
ADH (58-2/ 58-2-N)*	3	3	1	33
DCIS-G3 (58-1/ 58-2-N)*	5	3	2	50

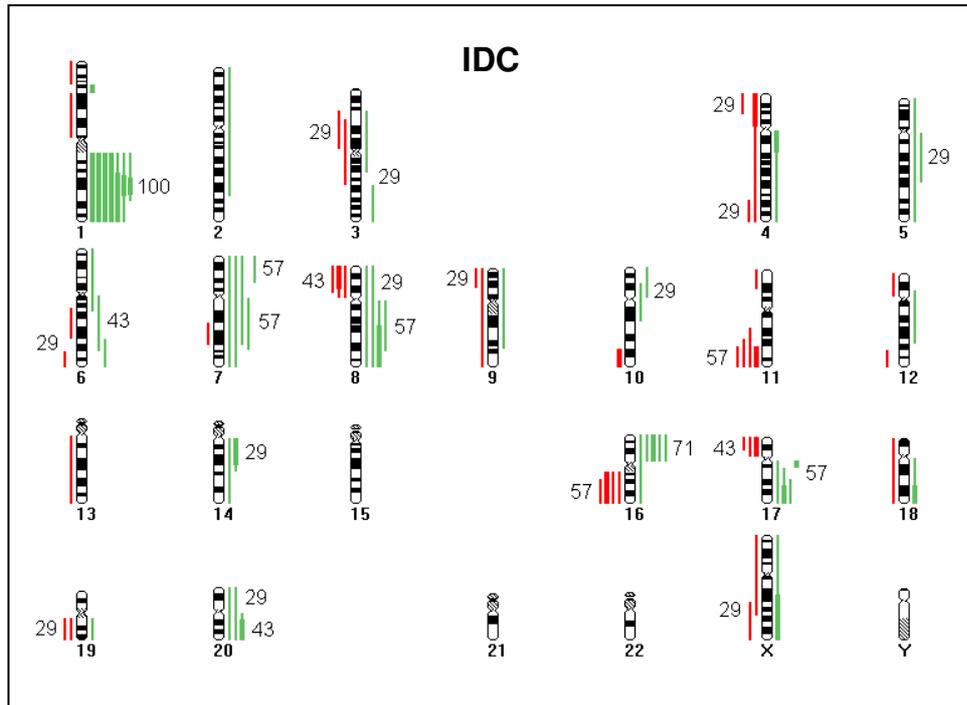


**Abbildung 3.14: CGH-Analyse von normalen Epithel- und angrenzenden Tumorzellen**

Bei zwei Patientinnen wurden von normalen Epithelzellen, angrenzend zur Tumorregion im gleichen Schnittpräparat Aberrationen nachgewiesen. (A) DCIS Grad 3 (Probe 90) und daran angrenzendes normales Epithel (90-N). (B) DCIS Grad 3 (58-1), ADH (58-2) und normale Zellen (58-2-N) im gleichen Gewebeschnitt. Die Histogramme zeigen alle chromosomalen Zugewinne und Verluste der einzelnen Gewebekomponenten. Dargestellt sind nur die Chromosomen mit Aberrationen. Balken rechts der Chromosomen: chromosomale Zugewinne, dicke Balken: Amplifikationen, Balken links der Ideogramme: chromosomale Verluste, dicke Balken: homozygote Deletionen.

### 3.3.6 CGH-Ergebnisse invasiv duktaler (IDC) und invasiv lobulärer Karzinome (ILC)

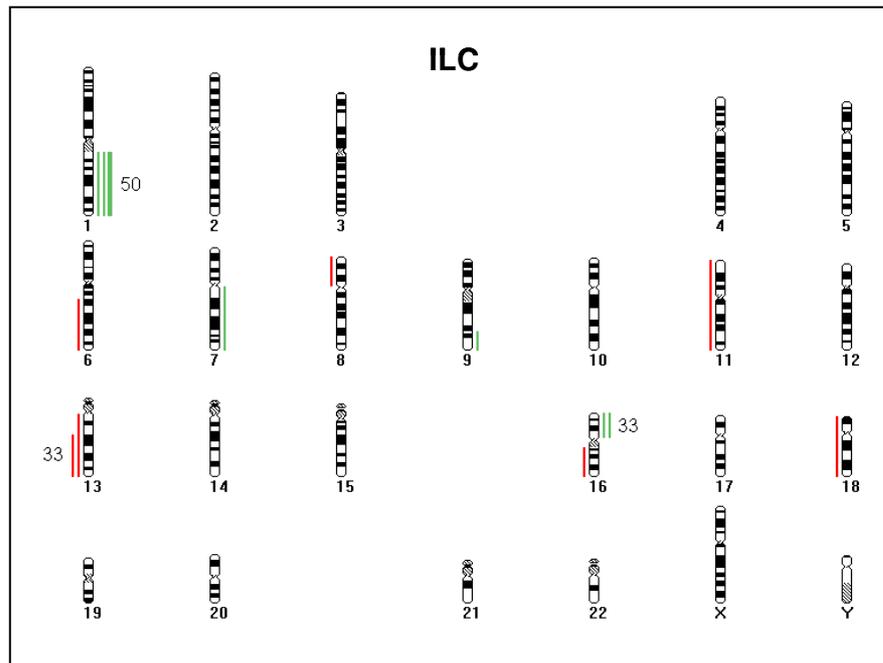
Es wurden Tumorproben von sieben Patientinnen mit einem IDC analysiert. Bei vier Patientinnen wurde die DNA aus ganzen Gewebeschnitten gewonnen und bei den anderen drei Patientinnen wurden die Tumorareale zuvor laser-mikrodisseziert. Der Median genetischer Alterationen betrug bei den IDC 12 (Bereich 3 bis 25) und war vergleichbar mit dem der DCIS mit Kerngrad 3 (siehe Boxplot Abbildung 3.11). Auch die Art der Veränderungen war ähnlich denen der DCIS mit Kerngrad 2 und 3. Am häufigsten waren Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q, 7p und 7q, 8q, 16p, 17q und 20q sowie Verluste auf 8p, 11q, 16q und 17p (siehe Abbildung 3.15). Amplifikationen wurden auf dem Chromosomenarm 1q bei den Proben aller Patientinnen und weiterhin vereinzelt in Regionen von 1p, 4q, 8q, 14q, 16p, 17q, 18q, 20q und Xq gefunden. Homozygote Deletionen traten auf den Chromosomenabschnitten 4p, 8p, 11q, 16q und 17p auf.



**Abbildung 3.15: Zusammenfassende CGH-Ergebnisse aller Patientinnen mit einem IDC**

Das Histogramm zeigt alle genetischen Veränderungen von sieben Patientinnen mit einem IDC. Es wurden komplexe Aberrationen, insbesondere Zugewinne genetischen Materials auf den Chromosomenabschnitten 1q, 7p und 7q, 8q, 16p, 17q und 20q sowie chromosomale Verluste auf den Chromosomen 8p, 11q, 16q und 17p detektiert. Weniger als zwei Aberrationen pro Chromosomenarm (Frequenz 29 %) wurden nicht berechnet. Rote Balken links der Chromosomen: chromosomale Verluste, dicke rote Balken: homozygote Deletionen; grüne Balken rechts der Ideogramme: chromosomale Zugewinne, dicke grüne Balken: Amplifikationen.

Die DNA aller untersuchten Gewebeproben von sechs Patientinnen mit einem ILC wurde aus ganzen Gewebeschnitten und ohne vorherige Laser-Mikrodissektion gewonnen. Im Median wurden 2 Aberrationen (Bereich 0 bis 7) pro Tumorprobe detektiert. Im Vergleich zu den LCIS wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ( $p = 0,10$ ), jedoch zwischen IDC und ILC ( $p = 0,01$ ) (siehe Abbildung 3.11). Zwei der ILC-Proben (Probe 6 und 7) wiesen keine genetischen Veränderungen auf. In Abbildung 3.16 sind die Aberrationen aller Patientinnen mit einem ILC zusammengefasst.



**Abbildung 3.16: Zusammenfassende CGH-Ergebnisse aller Patientinnen mit einem ILC**

Zusammengefasst sind alle Aberrationen von sechs Patientinnen mit einem ILC. Chromosomale Zugewinne und Verluste wurden auf den Chromosomenarmen 1q, 6q, 7q, 8p, 9q, Chr. 11, Chr. 13, Chr. 16 und Chr. 18 beobachtet. Genetische Veränderungen, die mit einer Häufigkeit von < 33 % auftraten, wurden nicht berechnet. Rote Balken links der Chromosomen: chromosomale Verluste; grüne Balken rechts der Ideogramme: chromosomale Zugewinne, dicke grüne Balken: Amplifikationen.

### 3.4 Hierarchische Clusteranalyse aller CGH-Ergebnisse

Die Aberrationsdaten aller durch konventionelle CGH analysierten Gewebeprobe (n = 84), einschließlich autologer Proben der gleichen Patientin (Pat. ID-1 bzw. -2) und an den Tumor angrenzende normale Epithelzellen (Pat. ID-N) wurden zusammen hierarchisch nach Ähnlichkeit zu Gruppen (Clustern) zusammengefasst. Dies erfolgte durch „*unsupervised learning*“ wie in Kapitel 2.10 beschrieben und unabhängig vom histologischen Typ der Tumore.

Anhand des Dendrogramms (siehe Abbildung 3.17, A) wurden 5 verschiedene Cluster identifiziert, die entsprechend ihrer wichtigsten Charakteristika von links nach rechts wie folgt benannt wurden: 1) „normal“, 2) „wenig aberrant“, 3) „stark aberrant“, 4) „Aberration 1q/ 16q“, 5) „Aberration 4/ 17“. Die Mehrzahl der analysierten Proben wurde dem „stark aberranten“ Cluster (27 %) und dem „1q/ 16q“ Cluster (33 %) zugeordnet. Der Tumor 87-DCIS-G2 konnte keinem der genannten Cluster zugeordnet werden und gruppiert sich separat zwischen Cluster 1 und Cluster 2. Er zeichnet sich durch Verluste genetischen Materials auf den Chromosomenarmen 2p und 6q aus (siehe Abbildung 3.17, B). Die Tumorprobe 86 (DCIS Grad 3) wurde als einzige Probe von der Clusteranalyse ausgeschlossen, da sie eine Vielzahl genetischer Veränderungen aufweist, die im Vergleich zu allen anderen Tumoren einem völlig

anderen Aberrationsmuster entsprechen, wie z. B. Verlusten genetischen Materials auf den Chromosomen 1, 2, 4, 21 und 22, die meist das gesamte Chromosom betreffen. Eine Gruppierung des chromosomal hoch aberranten Tumors durch das Analyseprogramm zu Cluster 1 „normal“ erschien nicht sinnvoll. Im Folgenden erfolgt die Auswertung der einzelnen Cluster.

### **3.4.1 Cluster 1 „normal“, n = 22 (26 %)**

In Cluster 1 wurden alle Tumorproben ohne Aberrationen und Proben mit unverändertem normalem Epithelgewebe eingruppiert. Bei Patientinnen mit zwei untersuchten Proben, von denen nur eine aberrant war und die andere nicht, gruppierte sich die mit Aberrationen in ein anderes Cluster (z. B. 71-1-LCIS in Cluster 4).

### **3.4.2 Cluster 2 „wenig aberrant“, n = 6 (7 %)**

In Cluster 2 gruppieren sich Tumore mit auffallend wenigen und nicht mehr als fünf veränderten Chromosomen ein. Meist sind die Chromosomen 8 und 16 betroffen. Beim q-Arm von Chromosom 8 wurde bei drei von sechs Tumorproben ein Zugewinn und bei zwei Proben gleichzeitig ein Verlust des chromosomalen p-Arms gefunden. Chromosom 16 ist bei allen Proben dieses Clusters verändert. Bei fünf Tumorproben ist der gesamte q-Arm deletiert und bei drei Proben ein Zugewinn des kurzen Arms festzustellen. Außerdem weisen zwei Proben einen Verlust von 17p auf.

### **3.4.3 Cluster 3 „stark aberrant“, n = 23 (27 %)**

Die Tumore dieser Gruppe tragen auffallend viele Aberrationen, z. T. kann fast jedes Chromosom betroffen sein. Eine enge Verwandtschaft auf Grund sehr ähnlicher Aberrationsmuster zwischen zwei verschiedenen Tumorproben gleicher Patientinnen kam jeweils durch unmittelbare Nachbarschaft im Dendrogramm zum Ausdruck, wie z. B. 88-1 und 88-2 sowie 54-1 und 54-2 (siehe Abbildung 3.17, A). In Kapitel 3.3.4 wurde gezeigt, dass diese autologen Tumorproben jeweils bis zu 70 % derselben genetischen Veränderungen aufweisen.

Tumorprobe 90-DCIS-G3 und die zugehörige Probe 90-N, aus als histologisch normal eingestuftem Epithel (Übereinstimmung gemeinsamer Aberrationen 59 %), zeigten eine etwas entferntere Beziehung zueinander, gruppierten sich aber innerhalb des gleichen Subclusters ein (siehe Abbildung 3.17, A). Bei drei Patientinnen mit zwei untersuchten Tumorproben, bestand keine Ähnlichkeit hinsichtlich der chromosomalen Veränderungen (79-1 und 79-2, 95-1 und 95-2, 104-1 und 104-2). Das kam daher, weil bei zwei Proben (95-1 und 104-2) keine und bei einer Probe (79-1) wenige Aberrationen nachweisbar waren und diese dem Cluster 1 bzw. dem Cluster 5 zugeordnet wurden.

Auf einer untergeordneten Ebene des Dendrogramms von Cluster 3 ist eine Unterteilung in drei kleinere Subcluster, 3a, 3b und 3c möglich.

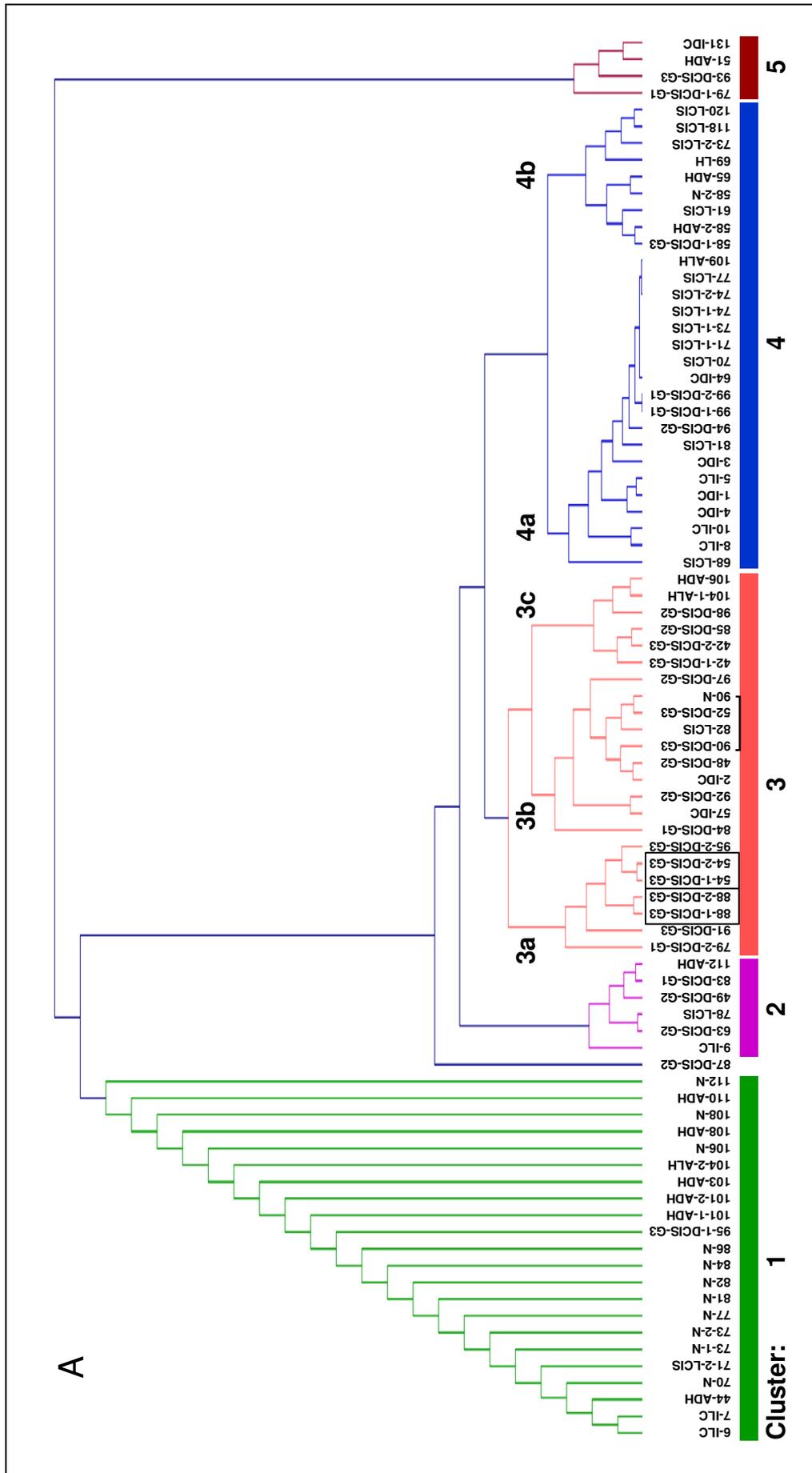
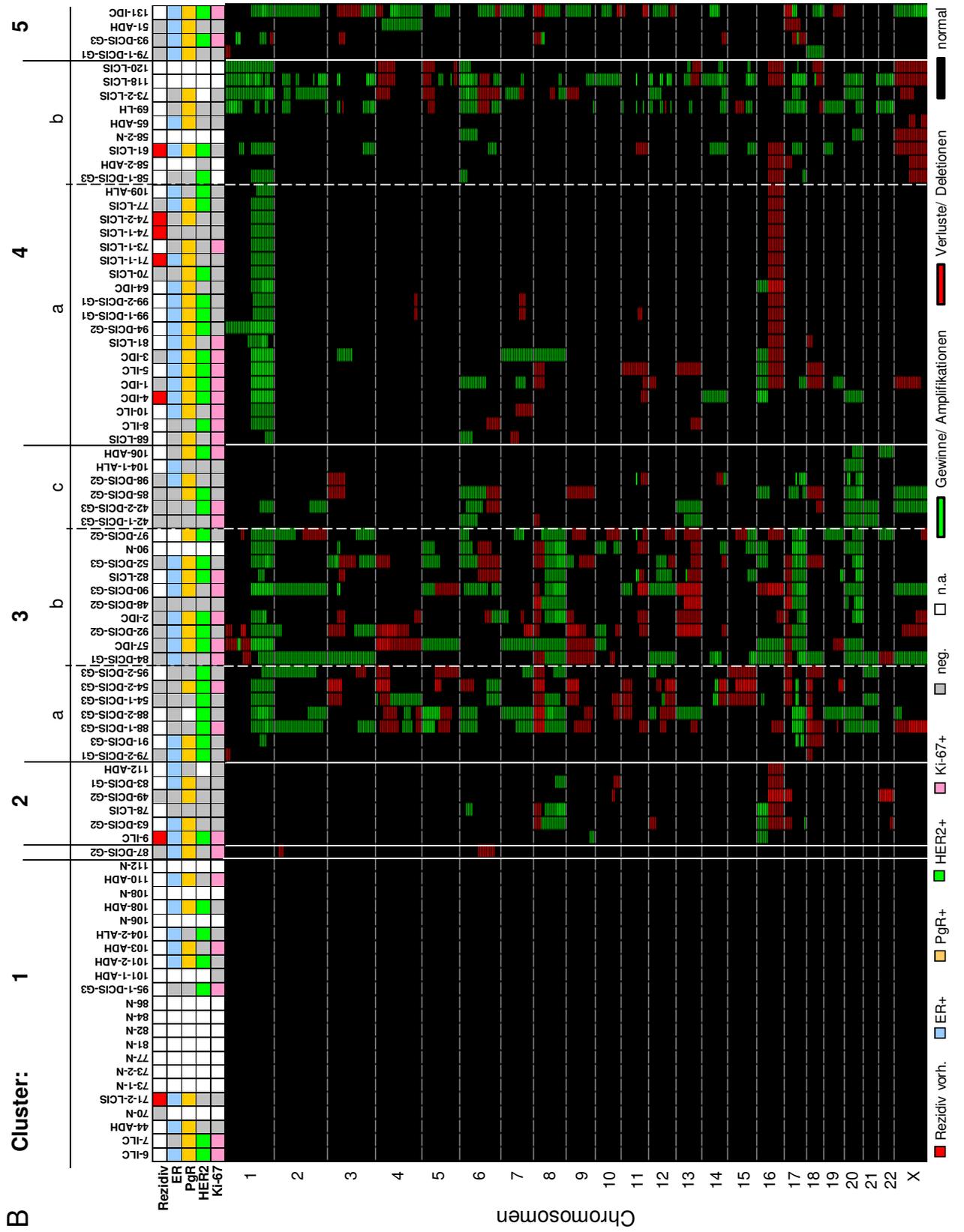


Abbildung 3.17: Hierarchische Ähnlichkeit der durch CGH analysierten Gewebeproben

*A) Dendrogramm:* Das Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeit der genetischen Aberrationen von 84 durch konventionelle CGH analysierten Gewebeproben zueinander, einschließlich der IDC, ILC, DCIS, LCIS, ADH unter Berücksichtigung des Gratings bei den DCIS (G1, G2 oder G3) und an den Tumor angrenzende normale Epithelzellen (N). Von einigen Patientinnen wurden zwei autologe Gewebeproben analysiert und in der Grafik mit -1 oder -2 bezeichnet. Die Aberrationsmuster benachbarter Proben im Bäumchen (z. B. 88-1, 88-2 und 54-1 und 54-2, markiert durch schwarzes Rechteck) sind sich ähnlicher als weiter von einander entfernte (z. B. 90-DCIS und 90-N, schwarze Klammer). Alle Proben wurden anhand der Aberrationen in fünf Hauptcluster gruppiert, von links nach rechts beginnend mit Cluster 1 bis 5. Cluster 3 und 4 wurden in weitere Subcluster (a, b, oder c) untergliedert. Probe 87 steht als einzige separat und ist keinem der 5 Cluster zugeordnet.

*B) Details der Cluster (siehe nächste Seite):* Die Spalten repräsentieren die 84 Gewebeproben der oben beschriebenen Entitäten. In den Zeilen sind alle Chromosomen aufsteigend aufgeführt. Für jede einzelne der 378 Chromosomenbanden (ein Kleinstkästchen entspricht einer Bande), außer beim Y-Chromosom, sind die genetischen Veränderungen entsprechend der farblichen Legende gekennzeichnet. Besonders charakteristisch für die Proben in Subcluster 3a und 3b beispielsweise sind eine Vielzahl von Aberrationen auf nahezu allen Chromosomen. Für die Untergruppe 4a sind Zugewinne der Chromosomenarme 1q und Verluste von 16q prägnant.

Die farbigen Kästchen oberhalb der Aberrationen zeigen ergänzend den Rezeptorstatus von ER, PgR, HER-2 und Ki-67 jeder einzelnen Probe und kennzeichnen die Patientinnen (Probe 71-1, 71-2 und 74-1, 74-2 sind jeweils autologe Gewebeproben), bei denen ein Rezidiv (rote Kästchen) aufgetreten ist. Graue Kästchen bedeuten, dass der Rezeptorstatus negativ ist bzw. dass bisher kein Rezidiv aufgetreten ist. Weiße Kästchen kennzeichnen Proben, von denen eine immunhistochemische Untersuchung nicht möglich war bzw. Patientinnen, von denen keine Informationen über einen Rückfall der Erkrankung vorliegen.



### 3.4.3.1 Custer 3a, n = 7 (8 %), Cluster 3b, n = 10 (12 %) und Cluster 3c, n = 6 (7 %)

Die Tumore innerhalb des Subclusters 3a und 3b wiesen meist eine große Zahl von Aberrationen auf. Besonders charakteristisch für beide Untergruppen ist ein Zugewinn von 1q, 8q, 17q und Chromosom 20 sowie ein Verlust von 8p und 17p. Darunter sind auch amplifizierte und durch homozygote Deletionen charakterisierte Regionen. Die wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Subclustern betreffen die Chromosomen 13, 18 und 20. In Cluster 3a ist Chromosom 13 nur bei einer von fünf verschiedenen Patientinnen (1 von 7 Tumorproben) komplett verloren, in Cluster 3b hingegen bei acht von zehn verschiedenen Patientinnen. Für Cluster 3a sind Verluste auf Chromosom 18 dominant. Alle Tumorproben zeigen zumindest einen Verlust des p-Arms und häufig ist das ganze Chromosom 18 deletiert. In Cluster 3b ist nur bei einer Probe (Probe 52) das gesamte Chromosom 18 verloren. Bei Chromosom 20 treten in der Gruppe 3a bei einer von fünf Patientinnen (Probe 88-1 und 88-2) und in Cluster 3b bei neun von zehn Patientinnen Zugewinne, meist des q-Arms auf.

Das Subcluster 3c wird durch ein etwas anderes Aberrationsmuster charakterisiert. Insgesamt haben die untersuchten Tumore in dieser Gruppe deutlich weniger Aberrationen. Ein Zugewinn von 1q kommt nur in einem Fall vor (Probe 42-2) und Zugewinne auf 8q und Verluste auf Chromosom 13 fehlen vollständig. Stattdessen ist bei beiden Proben der gleichen Patientin (42-1 und 42-2) ein Zugewinn von Chromosom 13 festgestellt worden. Auch Chromosom 17 ist nur bei zwei Patientinnen zugewonnen. Alle Tumorproben des Subclusters 3c zeigen auf Chromosom 20 einen Zugewinn genetischen Materials.

### 3.4.4 Cluster 4 „Aberration 1q/ 16q“, n = 28 (33 %)

Prägnant für die Tumorproben in Custer 4 sind Zugewinne auf Chromosom 1q (89 %) und Verluste des langen Arms von Chromosom 16 (71 %), die meist gemeinsam auftreten (68 %). In dieser Gruppe finden sich in erster Linie die LCIS und ILC, aber auch einige DCIS Grad 1 und Grad 2. Innerhalb des Dendrogramms von Cluster 4 gibt es zwei untergeordnete Cluster.

#### 3.4.4.1 Cluster 4a, n = 19 (23 %), Cluster 4b, n = 9 (11 %)

Die Proben im Subcluster 4a weisen die oben beschriebenen Veränderungen der Chromosomen 1 und 16 auf und zeigen ansonsten keine weiten übereinstimmenden auffälligen Muster. Im Subcluster 4b finden sich Tumore mit zusätzlichen Veränderungen auf Chromosom 6. Zugewinne auf dem p-Arm von Chromosom 6 treten bei 67 % der Proben versus 11 % in Cluster 4a auf. Ein weiterer Unterschied zeichnet sich beim X-Chromosom ab. Bei 89 % der Proben sind Verluste auf dem X-Chromosom zu verzeichnen versus 5 % in Cluster 4a. Insgesamt treten bei den

Proben aus Cluster 4b auch bei anderen Chromosomen gehäuft Aberrationen auf, die aber kein spezifisches Muster zeigen.

Eine unmittelbare Ähnlichkeit auf Grund der Gruppierung im gleichen Zweig des Dendrogramms zwischen zwei Proben der gleichen Patientin wurde zwischen 99-1-DCIS-G1 und 99-2-DCIS-G1 und zwischen 58-1-DCIS-G3 und 58-2-ADH gefunden. Das genetisch veränderte aber in der Histologie als normal klassifiziert Epithelgewebe 58-2-N gruppierte sich in einem Zweig höheren Grades ein. Die beiden analysierten Tumorproben von 73-LCIS wurden verschiedenen Subclustern zugeordnet, so dass hier nur eine entfernte Verwandtschaft besteht. Probe 73-1 zeigt nur die +1q/ -16q- Aberrationen und wurde daher in Cluster 4a einsortiert. Die zweite Probe 73-2 fällt auf Grund anderer Veränderungen, einschließlich des Zugewinns von 6p, des Fehlens von -16q und wegen Verlusten auf Chromosom X, in das Subcluster 4b. Zwischen den Proben 71-1-LCIS und 71-2-LCIS besteht wegen fehlender Aberrationen in der Gewebeprobe 2 (Cluster 1) keine Ähnlichkeit.

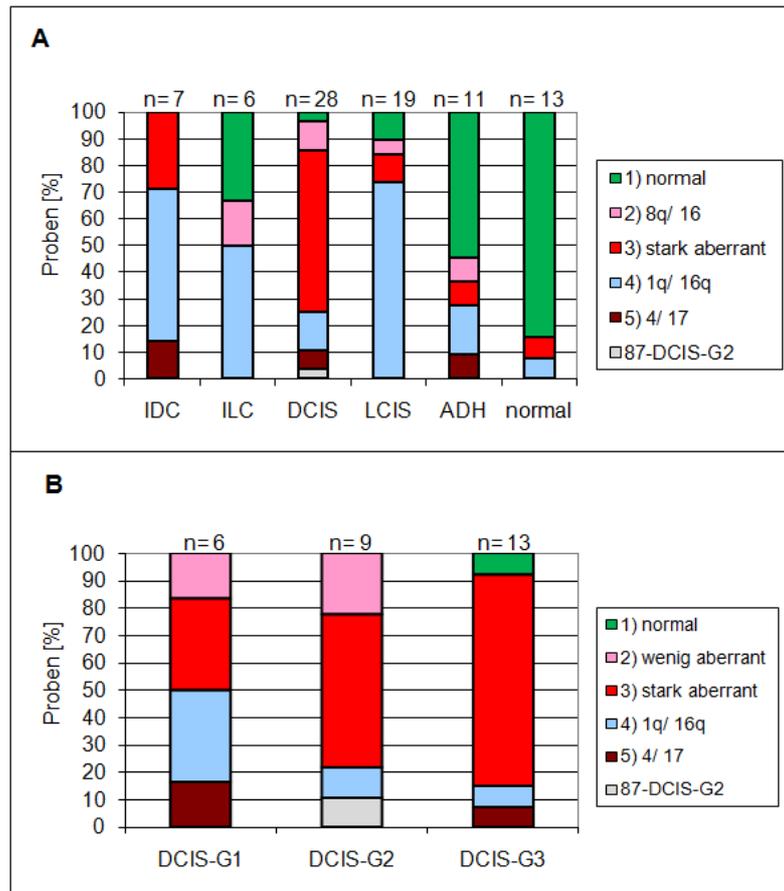
#### **3.4.5 Cluster 5 „Aberration 4/ 17“, n = 4 (5 %)**

Für dieses Cluster ist auffallend, dass drei der vier Tumorproben Verluste genetischen Materials auf Chromosom 17 zeigen und bei zwei Gewebeproben (Probe 51 und 131) große Teile von Chromosom 4 zugewonnen wurden. Die Tumorprobe 131-IDC zeichnet sich durch deutlich mehr Aberrationen als die Proben der anderen drei Patientinnen aus.

#### **3.4.6 Verbindung der Cluster mit klinischen- und histopathologischen Daten**

##### 1. Histologischer Typ

In Verbindung mit dem histologischen Typ wurden hoch signifikante Unterschiede zwischen den Clustergruppen festgestellt. Der prozentuale Beitrag der einzelnen Cluster innerhalb der verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des als normal eingestuftes Epithelgewebes, ist in Abbildung 3.18, A zusammengefasst. Die Mehrzahl der normalen Epithel- und der ADH-Proben wurden auf Grund des Vorhandenseins keiner oder nur weniger Aberrationen dem Cluster 1 zugeteilt (85 % aller normalen Epithelproben und 55 % der ADH-Proben). Der Beitrag der anderen Cluster zu den ADH und dem normalen Epithelgewebe ist eher gering. Cluster 4 (Aberration 1q/ 16q) repräsentiert 74 % aller LCIS-, 57 % der IDC- und 50 % aller ILC-Proben, während Cluster 3 insbesondere innerhalb der DCIS (61 %) dominiert. Cluster 2 umfasst 4 Tumorproben des duktales Typs und 2 Proben lobulären Typs. In Cluster 5 wurden 4 Proben des duktales Typs zugeteilt.



**Abbildung 3.18: Beitrag der Cluster innerhalb verschiedener histologischer Typen**

(A) Dargestellt ist der prozentuale Beitrag der Cluster innerhalb der untersuchten Tumortypen und des normalen Epithels aller 84 in Abbildung 3.17 erfassten Proben. (B) Anteil der Clustergruppen innerhalb der DCIS unter Berücksichtigung des Kerngrades (Grad 1, 2 und 3). Die Probe 87 wurde keinem der 5 Cluster zugeteilt und ist daher jeweils extra angegeben.

Mit zunehmendem nukleären Grading bei den DCIS zeigt sich eine Verschiebung zum stark aberranten Cluster 3, von 33 % bei den Grad 1, über 56 % bei den Grad 2 bis 77 % bei den DCIS mit Kerngrad 3 hin, während der Beitrag des 1q/16q-Clusters bei den Grad 1-Tumoren mit 33 % über Grad 2 mit 11 % auf 8 % bei Grad 3 reduziert ist. Im Cluster 2 mit genetischen Veränderungen der Chromosomen 8 und 16 sind DCIS mit Grad 3 nicht vertreten (siehe Abbildung 3.18, B).

Beim Vergleich der ADH mit den DCIS Grad 1 wird ein höherer Beitrag zu Cluster 1 (normal) unter allen ADH-Proben mit 55 % versus 0 % deutlich. Zum stark aberranten Cluster 3 wurden 33 % der DCIS Grad 1 und 9 % der ADH-Proben zugeordnet und zum 1q/16q-Cluster 33 % der DCIS Grad 1 und 18 % der ADH-Proben.

## 2. Rezidive, Alter und Hormonrezeptoren

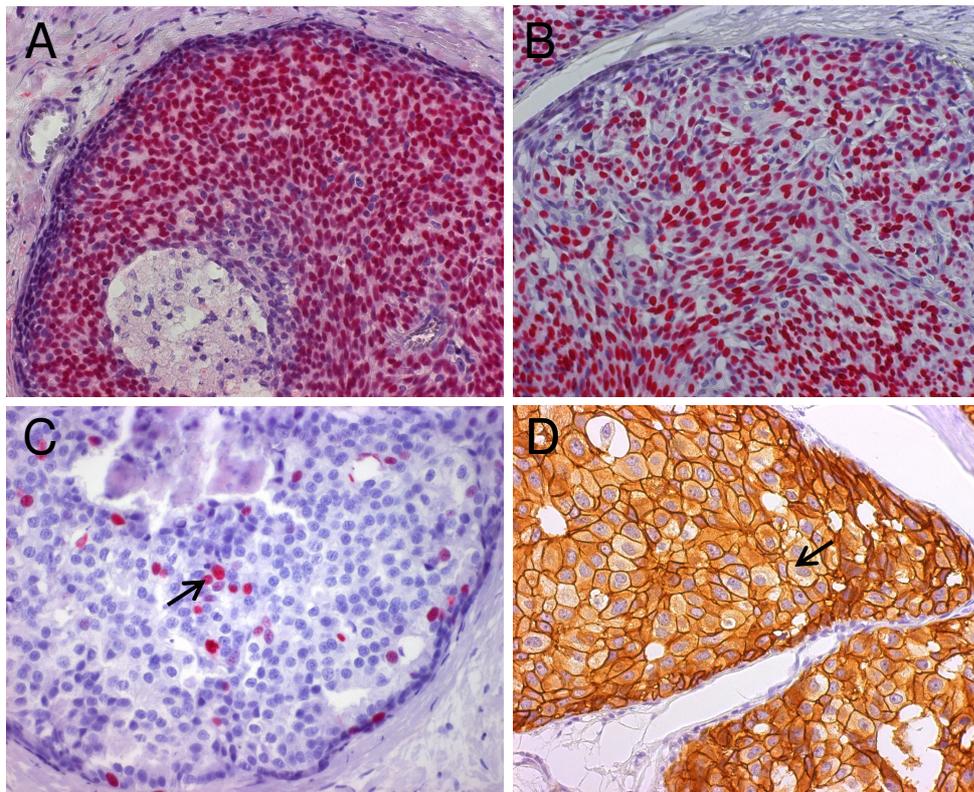
Von insgesamt 22 in allen Clustern aufgeführten Patientinnen liegen Informationen vor, ob ein Rückfall der Krebserkrankung aufgetreten ist (siehe Abbildung 3.17, B und im Anhang unter 9.2). Bei fünf der Patientinnen (23 %) wurde ein Rezidiv festgestellt. Darunter befanden sich zwei Patientinnen mit einem primär diagnostizierten invasiven Karzinom (9-ILC und 4-IDC) und drei Patientinnen mit einem LCIS (61, 71 und 74). Bei einer LCIS-Patientin (61) wurden bereits bei der Erstdiagnose multifokale Herde eines frühen invasiven Wachstums im Gewebeschnitt beobachtet. Dies führte trotz *Ablatio mammae* nach etwa 5,5 Jahren zu einem Rückfall der Erkrankung in Form eines ILC und zur Infiltration mit erfasster quergestreifter Skelettmuskulatur, welche oberhalb eines Brustimplantates auf der gleichen Seite auftraten. Bei den beiden anderen LCIS-Patientinnen zeigten sich keine invasiven bzw. mikroinvasiven Anteile in den Gewebeschnitten des Primärtumors. Nach zirka 2 Jahren wurde bei beiden Patientinnen ein weiteres LCIS festgestellt. In der Gruppe der DCIS ist von elf Patientinnen bekannt, dass bisher kein Rezidiv aufgetreten ist. Von den ADH- und ALH-Patientinnen liegen bisher meist keine Verlaufsdaten vor.

In der Zuordnung zu den Clustern zeigt sich, dass die 5 Patientinnen mit einem Rezidiv hauptsächlich in das 1q/16q-Cluster gruppieren, wobei Patientin 4-IDC, 71-1-LCIS und 74-1- und -2-LCIS dem Subcluster 4a und Patientin 61-LCIS dem Cluster 4b zugeteilt wurden (siehe Abbildung 3.17, B). Nur die 2. Probe von Patientin 71 wurde auf Grund nicht vorhandener Aberrationen dem Cluster 1 zugeordnet. In Cluster 2 befindet sich Patientin 9-ILC, deren analysierte Gewebeprobe nur einen Zugewinn der Region 9q32-qter und einen Zugewinn von 16p zeigte. Interessanterweise gab es in Cluster 3 mit den meist hoch aberranten Tumorproben (74 % DCIS) keine Rezidive. Verlaufsdaten liegen in diesem Cluster von 10 Patientinnen mit einem DCIS vor.

Hinsichtlich der Altersverteilung der Patientinnen gibt es keine Unterschiede zwischen den fünf Clustern. In jedem Cluster sind zwischen 20 % bis 33 % der unter 50-jährigen und zwischen 67 % bis 80 % der über oder 50 Jahre alten Patientinnen vertreten. Auch bezüglich der Tumorgroße, des Hormonrezeptorstatus von ER, PgR und Ki-67 sowie der Expression von HER-2/neu wurden keine clusterspezifischen Verteilungen festgestellt.

### 3.5 Immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Tumorstadien

Als prognostische bzw. prädiktive immunhistochemische Marker des Mammakarzinoms dienen der Proliferationsmarker Ki-67, die Tyrosinkinase Her-2/neu, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums spielt und die Hormonrezeptoren ER und PgR. Von 60 Patientinnen mit Vorläuferstadium bzw. invasivem Karzinom wurden diese immunhistochemischen Parameter an Schnittpräparaten bestimmt und ausgewertet. In Abbildung 3.19 sind Beispiele für positive immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten verschiedener DCIS gezeigt.



**Abbildung 3.19: Immunhistochemische Färbungen an Schnittpräparaten von DCIS**

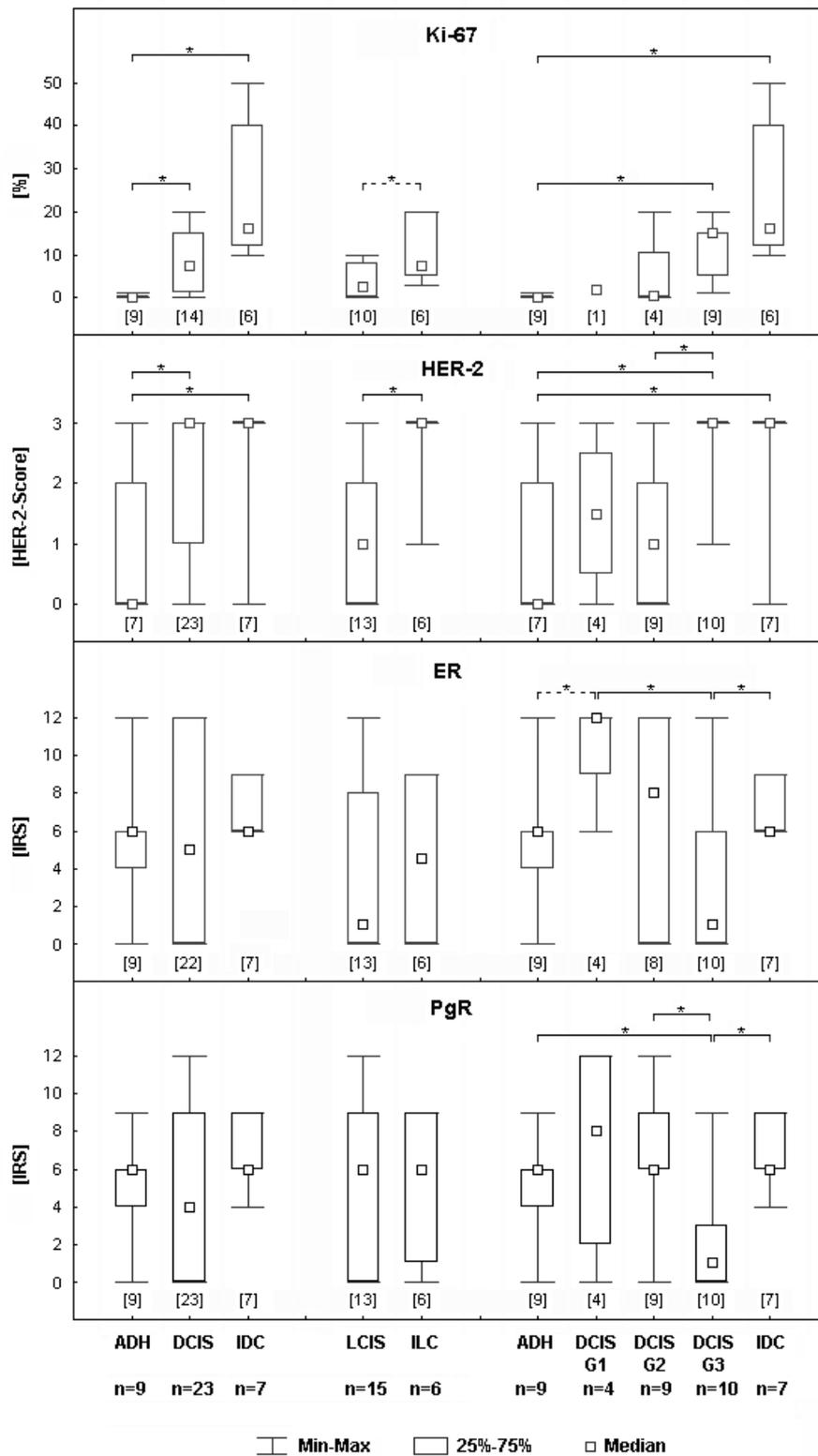
Immunhistochemische Färbung für ER, PgR, Ki-67 und HER-2/neu. In Bild A, B und C wurden die Zellkerne rot angefärbt und in Bild D weisen die Zellmembranen eine durchgängige und intensiv braune Färbung auf. (A) ER-positive Färbung eines DCIS Grad 1 (Probe 79-1), rezeptorreich, IRS 12, 200x, (B) PgR-positiv gefärbte Kerne eines DCIS Grad 1 (Probe 79-2), rezeptorreich, IRS 12, 200x, (C) schwach positive Ki-67-Färbung (zirka 10 %). Der Pfeil kennzeichnet positiv angefärbte Zellkerne eines DCIS mit Kerngrad 3 (Probe 90), 200x, (D) HER-2/neu-Überexpression (Score-Wert 3+) eines DCIS Grad 3 (Probe 91), 200x.

Mit fortschreitendem Tumorgrad wurde eine Zunahme der Zellproliferation sowie der Her-2/neu Expression beobachtet (siehe Abbildung 3.20). Die ER- und PgR-Expression stieg zunächst an, nahm im weiteren Verlauf ab, um schließlich wieder anzusteigen. Insgesamt war die Schwankungsbreite der einzelnen Score-Werte recht groß und erstreckte sich oft über den gesamten Bereich. In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse für alle untersuchten Tumorstadien aufgeführt. Diese werden in den folgenden Abschnitten separat und auch in Bezug auf die CGH-Ergebnisse dargestellt.

### 3.5.1 Hormonrezeptoren (ER und PgR)

Für die Hormonrezeptoren ER und PgR wurden ähnliche Expressionsniveaus an Schnittpräparaten in den unterschiedlichen Tumorgruppen gefunden. Hervorzuheben ist, dass die Tumore der ADH-Gruppe eher mäßig rezeptorreich (IRS 5-8) und die der DCIS Grad 1 rezeptorreich (IRS 9-12) waren. Besonders ausgeprägt war dies für ER, wo die Schwelle zur Signifikanz erreicht wurde ( $p = 0,054$ ). Von den DCIS Grad 1 zu den DCIS Grad 3 nahm der Nachweis der beiden Hormonrezeptoren an der Zelloberfläche kontinuierlich ab. Für ER waren die Unterschiede signifikant ( $p = 0,024$ ). Signifikante Unterschiede gab es u. a. zwischen den mehr rezeptorarmen (IRS 1-4) DCIS Grad 3 und den mäßig rezeptorreichen IDC (ER:  $p = 0,045$ , PgR:  $p = 0,005$ ), aber nicht zwischen den DCIS insgesamt und den IDC. Zwischen den LCIS und ILC war kein Unterschied zu sehen.

Beim Vergleich häufiger Aberrationen von ER-positiven und ER-negativen Tumoren mit gleichem Kerngrad wurde bei den DCIS Grad 2 (3 Tumore ER-positiv und 5 Proben ER-negativ) und der DCIS Grad 3 (jeweils fünf Patientinnen pro Gruppe) überwiegend eine ähnliche Verteilung von Zugewinnen und Verlusten chromosomalen Materials festgestellt und auch die Anzahl chromosomaler Aberrationen war nicht signifikant unterschiedlich. Eine Auflistung der häufigsten Aberrationen bei ER-positiven und ER-negativen Tumoren (größere Abweichungen fett markiert) sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Innerhalb der DCIS Grad 1 waren alle Tumore ER-positiv und konnten daher nicht unterteilt werden. ER-positive DCIS Grad 2 tendieren eher zum Zugewinn auf 1q und zum Verlust von 14q. Ein Zugewinn von 20q ist eher bei den ER-negativen DCIS Grad 2 häufiger. Ein übereinstimmender Trend zwischen den ER-negativen DCIS Grad 2 und Grad 3 wurde aber nur beim Verlust des langen Arms von Chromosom 14 gefunden. Spezifische Kombinationen von Aberrationen, die die ER-positiven oder -negativen DCIS Grad 3 miteinander teilen, traten nicht auf. Für die PgR-negativen und -positiven DCIS Grad 3 ergibt sich eine ganz ähnliche Verteilung von Zugewinnen und Verlusten, da 4 der 10 Tumore ER-negativ und gleichzeitig PgR-negativ sind (Probe 42-2, 58-1, 88-1, 95-1). In den chromosomalen Regionen, in denen die Hormonrezeptoren kartieren (ER auf 6q25.1 und PgR auf 11q22-23) wurde keine unterschiedliche Aberrationsfrequenz zwischen Rezeptor positiven und -negativen Tumoren gefunden.



**Abbildung 3.20: ER-, PgR-, HER-2/neu- und Ki-67-Status verschiedener Tumorstadien**

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung verschiedener Tumorgruppen sind als Boxplots (Median, 25 %- und 75 %-Quantile, minimaler und maximaler Wert) angegeben. Die Hormonrezeptoren ER und PgR wurden nach dem immunreaktiven Score (0 bis 12; 0 = negativ, 12 = stark positive Färbung) bewertet. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde die Anzahl der Ki-67-positiv gefärbten Zellen in Prozent angegeben. Die Expression von Her-2/neu wurde nach dem Score für den Herceptest (0 bis 3+; 0 und 1+ = negativ, 2+ und

3+ = positiv) beurteilt. Auf der X-Achse sind die einzelnen Tumorgruppen und die Anzahl der darin eingeschlossenen Patientinnen aufgetragen. Bei Vorliegen von zwei Gewebeproben einer Patientin wurde bei ungleichem Ergebnis das prognostisch ungünstigere in die Berechnung einbezogen und jede Patientin nur ein Mal berücksichtigt. Unter den jeweiligen Boxplots steht die Anzahl der auswertbaren Schnittpräparate einer Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test;  $p \leq 0,05$ ) zwischen zwei Tumorgruppen sind mit einer Klammer und einem Stern (\*) gekennzeichnet (gestrichelte Klammer: Schwelle zur Signifikanz,  $p = 0,05$ ).

**Tabelle 3.7: Vergleich der Aberrationen im CGH-Profil von ER-negativen und ER-positiven Tumoren**

Eine unterschiedliche Häufigkeit von Aberrationen zwischen ER-negativen und ER-positiven Tumoren gleichen Kerngrades mit einer Differenz von  $\geq 40\%$  wurde fett markiert. ER-negative Tumore (ER-): 42-2, 58-1, 88-1, 95-1, 54-2; ER-positive Proben (ER+): 52, 86, 90, 91, 93.

Aberration	DCIS Grad 2		DCIS Grad 3	
	ER-	ER+	ER-	ER+
+1q	<b>0/ 3 (0 %)</b>	<b>2/ 5 (40 %)</b>	4/ 5 (80 %)	4/ 5 (80 %)
+3p	1/ 3 (33 %)	2/ 5 (40 %)	<b>0/ 5 (0 %)</b>	<b>2/ 5 (40 %)</b>
+5p	-	-	<b>1/ 5 (20 %)</b>	<b>3/ 5 (60 %)</b>
+6p	1/ 3 (33 %)	0/ 5 (0 %)	3/ 5 (60 %)	3/ 5 (60 %)
-8p	1/ 3 (33 %)	2/ 5 (40 %)	<b>2/ 5 (40 %)</b>	<b>4/ 5 (80 %)</b>
+8q	1/ 3 (33 %)	2/ 5 (40 %)	1/ 5 (20 %)	1/ 5 (20 %)
-9p	1/ 3 (33 %)	1/ 3 (33 %)	<b>2/ 5 (40 %)</b>	<b>0/ 5 (0 %)</b>
-11q	1/ 3 (33 %)	2/ 5 (40 %)	1/ 5 (20 %)	1/ 5 (20 %)
+12q	-	-	<b>0/ 5 (0 %)</b>	<b>2/ 5 (40 %)</b>
-14q	<b>0/ 3 (0 %)</b>	<b>2/ 5 (40 %)</b>	<b>1/ 5 (20 %)</b>	<b>3/ 5 (60 %)</b>
-16q	1/ 3 (33 %)	2/ 5 (40 %)	2/ 5 (40 %)	1/ 5 (20 %)
-17p	2/ 3 (67 %)	2/ 5 (40 %)	<b>1/ 5 (20 %)</b>	<b>3/ 5 (60 %)</b>
+17q	2/ 3 (67 %)	3/ 5 (60 %)	<b>3/ 5 (60 %)</b>	<b>5/ 5 100 %)</b>
+20q	<b>2/ 3 (67 %)</b>	<b>1/ 5 (20 %)</b>	2/ 5 (40 %)	2/ 5 (40 %)

### 3.5.2 Zellproliferation (Ki-67)

Die invasiven Karzinome zeichneten sich im Vergleich zu den Vorläuferläsionen durch eine höhere Proliferationsaktivität aus. In der Gruppe der ADH waren nahezu alle Tumorproben Ki-67-negativ, lediglich 2 von 9 Proben hatten zu 1 % positiv gefärbte Zellen. Die Proliferation war bei den DCIS gegenüber den ADH signifikant erhöht (U-Test,  $p = 0,002$ ). In der Gruppe der DCIS Grad 3 zeigten Tumore mit mikroinvasiven Anteilen im Gewebeschnitt (Probe 58-1, 52 und 86) im Trend eine erhöhte Proliferationsaktivität gegenüber denen ohne mikroinvasives Wachstum (Median: 15 % versus 8 %,  $p = 0,07$ ). Bei den IDC wurde die höchste Proliferationsaktivität mit einem Median von 16 % Ki-67-positiv gefärbter Zellen gefunden. Dies war im Vergleich zu den ADH hoch signifikant verschieden ( $p = 0,001$ ), jedoch nicht zu den DCIS ( $p = 0,063$ ). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den DCIS und LCIS ermittelt ( $p = 0,038$ ) und zwischen LCIS und ILC wurde die Grenze zur Signifikanz erreicht ( $p = 0,051$ ).

Hinsichtlich der genomischen Aberrationen wurden bei den DCIS Grad 3 Tumoren mit einem geringen Anteil Ki-67-positiver Zellen von  $> 0$  bis 5 % ( $n = 4$ ) weniger Aberrationen gefunden als bei Tumoren mit einer erhöhten Proliferationsrate zwischen 10 bis 20 % ( $n = 6$ ) (Median: 10 versus 18,  $p = 0,79$ ). In der Gruppe mit höherer Zellproliferation wurden häufiger Zugewinne auf 6p (83 % vs. 33 %) und Verluste auf 6q (50 % vs. 0 %) und 17p (67 % vs. 0 %) detektiert. Eine Amplifikation in der Region 14q13-q21 wurde in 2 von 6 Fällen (33 %), aber nicht in der Gruppe mit geringer Proliferationsaktivität gefunden.

### 3.5.3 Überexpression von HER-2/neu und Vergleich zur Amplifikation von *Her-2/neu* mittels CGH-Techniken

Die HER-2/neu-Überexpression am Gewebeschnitt in der Gruppe der ADH war mit Ausnahme von zwei Proben (101-2 und 106) negativ. Ein sprunghafter Anstieg der Expression war von den DCIS Grad 2 zu den DCIS Grad 3 zu verzeichnen. Nahezu alle DCIS Grad 3 (außer Probe 90) hatten Score-Werte von 3+, entsprechend den Ergebnissen der invasiv duktaalen Karzinome. Die Expression bei den LCIS nahm eine intermediäre Stellung ein, vergleichbar mit den DCIS Grad 1 und 2. Zwischen den LCIS und ILC unterschied sich die Expression signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 3.20).

Die Ergebnisse der HER-2/neu-Überexpression am Gewebeschnitt und die der DNA-Amplifikation mittels konventioneller CGH sind vergleichend in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Insgesamt waren 66 von 72 Tumorproben unterschiedlicher Entität mit beiden Techniken auswertbar. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie und denen der CGH konnte in 60 % der Gewebeproben festgestellt werden ( $p = 0,005$ ). Die Übereinstimmung war in der Gruppe der DCIS Grad 2 mit 78 % und bei den DCIS Grad 3 und den IDC mit 71 % am höchsten. Abweichende Ergebnisse wurden z. B. bei den ALH gefunden. Mit der

konventionellen CGH-Technik wurden alle vier analysierten Proben als *Her-2/neu*-negativ ermittelt, während zwei Proben eine für HER-2/neu positive immunhistochemische Reaktion zeigten.

**Tabelle 3.8: Vergleich der Überexpression und Amplifikation von Her-2/neu**

*In der immunhistochemischen Färbung wurde ein Score von 2+ und 3+ als Her-2/neu-positiv gewertet und in der CGH-Analyse eine Amplifikation bzw. ein Zugewinn in der Region 17q21, in die das Gen kartiert.*

Histologie [Anzahl Proben]	Immunhistochemie HER-2/neu pos.	konv. CGH HER-2/neu pos.	Übereinstimmung Anzahl (%)
ADH [11]	2/ 11	0/ 11	6 (55%)
ALH [4]	2/ 4	0/ 4	2 (50%)
DCIS Grad 1 [6]	3/ 6	1/ 6	2 (33%)
DCIS Grad 2 [9]	4/ 9	5/ 9	7 (78%)
DCIS Grad 3 [14]	12/ 14	10/ 14	10 (71%)
DCIS gesamt [29]	19/ 29	16/ 29	19 (66%)
LCIS [15]	4/ 15	5/ 15	10 (67%)
IDC [7]	6/ 7	4/ 7	5 (71%)
ILC [6]	5/ 6	0/ 6	1 (17%)

Unter Einbeziehung der Ergebnisse von konventioneller und Array-CGH-Techniken ergab der Vergleich zu den immunhistochemischen Analysen für *Her-2/neu* eine Übereinstimmung bei fünf von sechs DCIS-Proben (siehe Tabelle 3.9). Mit der konventionellen und Array-CGH-Methode wurden drei von sechs Proben als *Her-2/neu*-positiv ermittelt. Durch immunhistochemische Färbung wurde bei vier von sechs Proben eine Überexpression des Gens nachgewiesen. Die Einbeziehung der Array-CGH-Technik führte zu keiner weiteren Änderung. Eine detaillierte Auswertung der Array-CGH-Ergebnisse der untersuchten Tumore wird in Kapitel 3.7 zusammengefasst.

**Tabelle 3.9: Vergleich der Ergebnisse für Her-2/neu nach immunhistochemischer Färbung, konventioneller CGH und Array-CGH**

Scorewerte von 2+ und 3+ wurden in der immunhistochemischen Färbung als Her-2/neu-positiv gewertet und in der CGH-Analyse eine Amplifikation bzw. ein Zugewinn in der Region 17q21.

Diagnose, Pat.-ID	Immunhistochemie	konv. CGH	Array-CGH
DCIS 79-2	+	-	-
DCIS 85	+	+	+
DCIS 86	+	+	+
DCIS 87	-	-	-
DCIS 88-2	+	+	+
DCIS 98	-	-	-

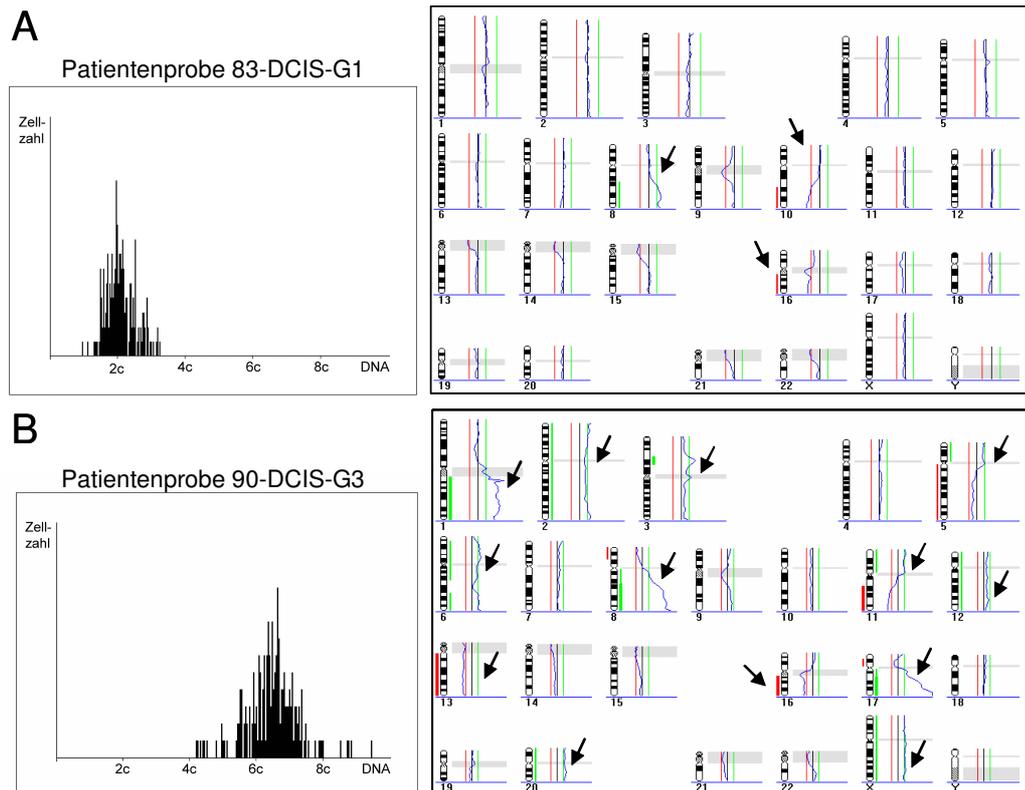
*Her-2/neu-positiv (+) und Her-2/neu-negativ (-)*

### 3.6 DNA-Zytometrische Analysen

Die zytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes von Tumorzellpopulationen erfolgte an Interphasekernen Feulgen-gefärbter Schnittpräparate von 19 DCIS-Patientinnen sowie an Imprints von drei Patientinnen mit IDC und vier Patientinnen mit einem ILC. Für alle 26 Tumore liegen auch CGH-Ergebnisse vor. In Abhängigkeit vom Ploidiestatus wurde eine unterschiedliche Frequenz chromosomaler Aberrationen im CGH-Profil festgestellt. Bei hoch aneuploiden Tumoren traten Aberrationen häufig an nahezu allen Chromosomen auf. Häufig wurden Zugewinne oder Verluste ganzer Chromosomen und vermehrt Amplifikationen gefunden. In Abbildung 3.21 sind typische Beispiele für DNA-Histogramme und korrespondierende CGH-Profile eines diploiden und eines aneuploiden DCIS gezeigt.

In Tabelle 3.10 sind die DNA-zytometrischen Ergebnisse aller untersuchten Tumore unter Berücksichtigung des Kerngrades zusammengefasst. Mit zunehmendem Kerngrad bei den DCIS nahm die Häufigkeit aneuploider Tumore zu ( $p = 0,007$ ) und auch der prozentuale Anteil an Zellen oberhalb der 5c-Schwelle stieg an, wenn diploide und aneuploide Tumore gemeinsam betrachtet wurden. Zwei DCIS Grad 1 waren diploid, ein DCIS Grad 1 (Probe 99-1 mit 5 Aberrationen) wurde als aneuploid eingestuft. Im DNA-Histogramm dieses Tumors waren zwei Stammlinien mit deutlichen Peaks im diploiden und tetraploiden Bereich zu erkennen. Für Aneuploidie sprach auch der Anteil von 3,5 % an Zellen oberhalb der 5c-Schwelle. Außerdem war der Tumor HER-2/neu-positiv (Score-Wert 3+). Die DCIS Grad 2 waren ebenfalls überwiegend diploid. Bei den beiden aneuploiden Tumoren mit Kerngrad 2 war die 5c-ER gegenüber den Grad 1 Tumoren deutlich erhöht und entsprach den Werten aneuploider DCIS

Grad 3. Alle DCIS Grad 3 waren aneuploid, drei der Proben (Probe 52, 58-1 und 90) hatten einen Ploidiegrad von  $> 5c$ . Die ausgewählten invasiven Karzinome zeigten häufiger Stammlinien im  $2c$ -Bereich. Diesem Ergebnis wurde allerdings wegen der geringen Zahl analysierter invasiver Tumore kein großes Gewicht beigemessen. Von zwei der invasiven Karzinome (Probe 4-IDC und 9-ILC) ist bekannt, dass ein Rückfall der Tumorerkrankung auftrat. Diese hatten einen Ploidiegrad von  $2c$  und es wurden 2 und 5 Aberrationen in den CGH-Profilen ermittelt.



**Abbildung 3.21: DNA-Histogramm und CGH-Profil eines diploiden und hoch aneuploiden Tumors**

(A) DNA-Histogramm (links) mit einer Tumorzellpopulation mit diploiden Chromosomensatz ( $2c$ ) am Beispiel eines DCIS Grad 1 (Probe 83). Die Pfeile im CGH-Profil (rechts) des gleichen Tumors markieren die drei veränderten Chromosomen (Zugewinn auf  $8q$  und Verluste auf  $10q$  und  $16q$ ). (B) DNA-Stammlinie eines DCIS Grad 3 (Probe 90) bei  $6,4c$ . Probe mit komplex aberrantem Karyotyp, d. h. auf nahezu allen Chromosomen treten Zugewinne oder Verluste genetischen Materials auf (durch Pfeile im CGH-Profil gekennzeichnet). Es wurden in jedem Schnittpräparat nach Feulgen-Färbung normale Leukozytenzellkerne als Referenz und 200 Tumorzellkerne „at random“ gemessen.

**Tabelle 3.10: DNA-Zytometrie und CGH-Analyse diploider und aneuploider Tumore unter Berücksichtigung des Kerngrades bei DCIS**

DCIS Grad 3 zeigten eine deutlich höhere Aneuploidierate als Grad 1 und Grad 2 Tumore (Chi-Quadrat-Test,  $p = 0,007$ ). Die 5c-ER und Anzahl an Aberrationen tendierten in allen Tumortypen zu höheren Werten in aneuploiden Tumoren im Vergleich zu diploiden Tumoren. Diese Tendenz zeigte wegen zu niedriger Fallzahlen keine statistische Signifikanz (Mann-Whitney-U-Test), außer bei der 5c-ER und nur bei Gruppierung von DCIS Grad 1/ Grad 2 ( $p = 0,02$ ) sowie von IDC/ ILC ( $p = 0,037$ ). Bei gemeinsamer Betrachtung diploider und aneuploider Tumore wurde nur hinsichtlich der Anzahl an Aberrationen ein signifikanter Anstieg zwischen den DCIS Grad 1 und Grad 3 beobachtet ( $p = 0,023$ ), nicht aber bezüglich der 5c-ER ( $p = 0,091$ ).

Tumortyp	diploid			aneuploid		
	n	5c-ER [%] <sup>x</sup>	CGH-Aberr. <sup>x</sup>	n	5c-ER [%] <sup>x</sup>	CGH-Aberr. <sup>x</sup>
DCIS Grad 1	2/ 3 (67 %)	0,5 (0-1,0)	3 (2-3)	1/3 (33 %)	3,5	5
DCIS Grad 2	4/ 6 (67 %)	0,3 (0-2,5)	9 (2-22)	2/ 6 (33 %)	30 (18-42)	14 (10-18)
DCIS Grad 3	0/ 10 (0 %)	-	-	10/ 10 (100 %)	19 (0-98)	16 (4-22)
DCIS gesamt	6/ 19 (32 %)	0,3 (0-2,5)	6 (2-22)	13/ 19 (68 %)	18 (0-98)	13 (4-22)
IDC	3/ 4 (75 %)	0 (0)	5 (3-6)	1/ 4 (25 %)	5	17
ILC	5/ 6 (83 %)	0 (0-0,5)	2 (0-7)	1/ 6 (17 %)	2	3

(<sup>x</sup>) Medianwerte (Minimum - Maximum)

Die Tabelle 3.11 zeigt den Vergleich zwischen diploiden und aneuploiden Tumoren in Bezug auf CGH-, DNA-zytometrische und immunhistochemische Parameter. Der Anteil von Tumorzellen oberhalb der 5c-Schwelle stieg von 0,3 % bei den diploiden DCIS auf 18 % bei den aneuploiden DCIS an ( $p = 0,006$ ). Weiterhin war vom diploiden zum aneuploiden Status eine Veränderung der Hormonrezeptoren von rezeptorreich für den Marker ER und mäßig rezeptorreich für den Marker PgR zu rezeptorarm, eine Verschiebung von HER-2/neu-negativem zu HER-2/neu-positivem Status ( $p$ -Werte  $\leq 0,05$ ) sowie eine Tendenz zu häufigeren CGH-Aberrationen und einer Zunahme der Zellproliferation zu beobachten. Diese Veränderungen waren sowohl für die DCIS als auch für die invasiven Karzinome zu erkennen, zeigten aber bei den invasiven Tumoren wahrscheinlich wegen niedriger Fallzahlen keine statistische Signifikanz.

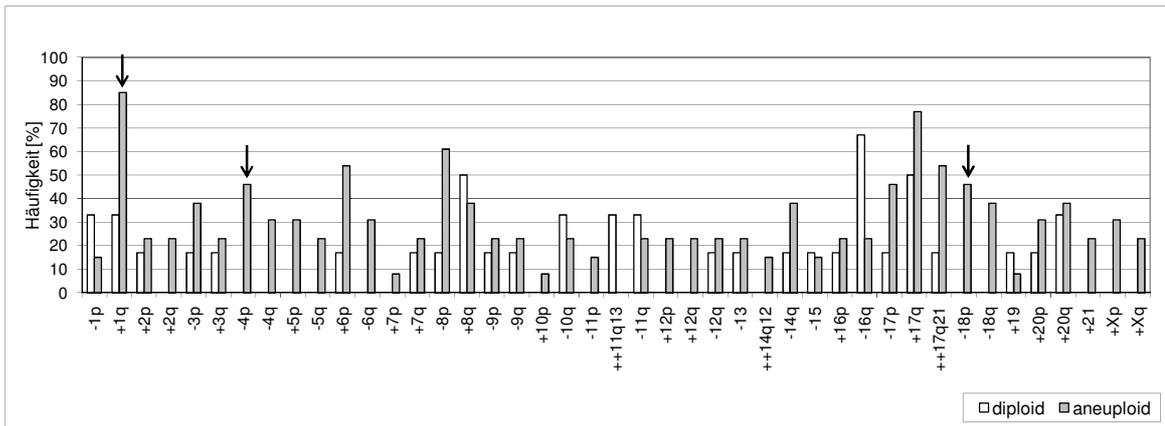
**Tabelle 3.11: Vergleich von diploiden und aneuploiden Tumoren hinsichtlich CGH-, DNA-zytometrischer- und immunhistochemischer Parameter**

*Aneuploide DCIS zeigen im Vergleich zu diploiden DCIS signifikant höhere Werte für die Parameter 5c-ER, HER-2/neu, niedrigere Werte für ER und PgR sowie eine Tendenz zu häufigeren CGH-Aberrationen und höherer Expression von Ki-67. Die IDC und ILC wurden in einer Gruppe zusammengefasst und zeigten tendenziell ähnliche Ergebnisse wie die DCIS. Außer bei der 5c-ER ( $p = 0,037$ ) waren die Unterschiede nicht signifikant.*

Tumortyp (Ploidie)	n	5c-ER [%] <sup>x</sup>	CGH-Aberr. <sup>x</sup>	ER [IRS] <sup>x</sup>	PgR [IRS] <sup>x</sup>	HER2 [Score] <sup>x</sup>	Ki-67 [%] <sup>x</sup>
DCIS (diploid)	6	0,3 (0-2,5)	6 (2-22)	12 (4-12)	8 (3-12)	1 (0-3)	0 (0-1)
DCIS (aneuploid)	13	18 (0-98)	13 (4-22)	2 (0-12)	3 (0-9)	3 (1-3)	10 (0-20)
p-Wert		0,006 *	0,079	0,023 *	0,026 *	0,010 *	0,166
IDC/ ILC (diploid)	8	0 (0-0,5)	3 (0-7)	6 (0-9)	9 (1-9)	3 (0-3)	10 (3-20)
IDC/ ILC (aneuploid)	2	3,5 (2-5)	10 (3-17)	3 (0-6)	2 (0-4)	3 (3-3)	15 (10-20)
p-Wert		0,037 *	0,240	0,296	0,117	0,602	0,464

<sup>(x)</sup> Medianwerte (Minimum - Maximum); (\*) Signifikante Unterschiede zwischen diploiden und aneuploiden Tumoren (Mann-Whitney-U-Test;  $p \leq 0,05$ )

Einen detaillierten Vergleich zwischen diploiden und aneuploiden DCIS hinsichtlich der Häufigkeit der in den CGH-Profilen gefundenen Aberrationen zeigt die Abbildung 3.22. Diploide DCIS ( $n = 6$ ) hatten im Median sechs Aberrationen und aneuploide DCIS ( $n = 13$ ) 13 Aberrationen pro Probe. Für die diploiden Tumore waren vor allem Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q, 8q, 17q und 20q und Verluste auf 10q, 11q und 16q prägnant. Außerdem wurden in 2 von 6 Proben Amplifikation auf den Banden 11q13 und 17q21 detektiert. Aneuploide DCIS zeigten häufig Zugewinne auf 1q, 6p, 8q, 17q und 20q, einschließlich mehrerer Amplifikationen auf 1q, 8q 14q12-q21 und 17q, (nicht alle in Abbildung 3.22 gezeigt) und Verluste auf 4p, 8p, 14q, 17p, 18p und 18q. Am größten war der Unterschied auf dem Chromosomenarm 1q (diploid 2/ 6 (33 %) versus aneuploid 11/ 13 (85 %)).



**Abbildung 3.22: Häufige Aberrationen im CGH-Profil von diploiden und aneuploiden DCIS**  
 Dargestellt ist die Aberrationsfrequenz [%] für alle Chromosomenarme und einiger Subregionen diploider ( $n = 6$ ) und aneuploider DCIS ( $n = 13$ ) unabhängig von ihrem Kerngrad. Die Pfeile markieren signifikante Abweichungen (Chi-Quadrat-Test;  $p \leq 0,05$ ) zwischen diploiden und aneuploiden Tumoren. Zugewinne sind mit (+), Verluste mit (-) und Amplifikationen mit (++) gekennzeichnet.

### 3.7 Array-CGH-Analyse an ausgewählten DCIS

Die hochauflösende Array-CGH-Analyse an genomischer DNA, die aus Paraffinmaterial isoliert wurde, stellte eine besondere Herausforderung dar, insbesondere wenn nach der Laser-Mikrodissektion auf Grund der geringen Anzahl an Tumorzellen ein Amplifikationsschritt erforderlich war. Entsprechend der Vorversuche zur Optimierung (siehe Kapitel 3.2) wurde die Array-CGH-Methode an ausgewählten Tumorproben duktaler *in situ*-Karzinome angewandt, die zuvor schon erfolgreich auf Metaphasechromosomen hybridisiert wurden.

#### 3.7.1 DNA-Qualität und Auswertbarkeit der Array-CGH-Analysen

Um Tumor-DNA hoher Qualität für die Array-CGH-Analysen einzusetzen, wurden elf durch Ligations-PCR präamplifizierte Proben mit ausschließlich optimalen Hybridisierungsergebnissen aus der konventionellen CGH ausgewählt. Als Anhaltspunkt für eine gute DNA-Qualität wiesen diese Proben nach einer Kontroll-PCR zusätzlich meist ein spezifisches Produkt im Agarosegel auf (siehe Kapitel 2.11.3). Dazu wurden PCR-Reaktionen mit zwei verschiedenen Primerpaaren (*TP53*-PCR und *D5S500*-PCR) durchgeführt, deren Produkte Fragmente mit unterschiedlicher Länge ergeben sollten (250 bp und 134 bp). Die folgende Übersicht zeigt, welche der elf Tumorproben, die in der Kontroll-PCR eine genspezifische Bande aufwiesen, zu einem auswertbaren Array-CGH-Ergebnis führten (siehe Tabelle 3.12).

**Tabelle 3.12: Kontroll-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität vor einer Hybridisierung**

Tumor-ID	TP53-PCR (250 bp)	D5S500-PCR (134 bp)	Auswertbare konv. CGH	Auswertbare Array-CGH
79-2, 86, 87, 88-2	+	+	+	+
85	n.d.	n.d.	+	+
98	-	+	+	+
54-1, 84, 93	-	+	+	-
88-1, 90	+	+	+	-

(+) spezifisches PCR-Produkt vorhanden; (-) keine Bande im Gel; n.d. Analyse nicht durchgeführt

Von Tumorprobe 85 wurde keine Kontroll-PCR durchgeführt. Dennoch konnte diese durch Array-CGH analysiert und ausgewertet werden. Bei den Proben 54-1, 84, 93 und 98 wurde kein 250 bp-Fragment nachgewiesen. Nur bei Probe 98 waren die Fluoreszenzsignale für die Array-CGH-Auswertung ausreichend. Die Durchführung der Kontroll-PCR als Qualitätskontrolle für die Integrität der DNA hat sich in der Mehrzahl der Fälle als Vorteil erwiesen. Drei von vier DNAs, die einen Ausfall in der PCR zeigten, ergaben nicht auswertbare Chip-Hybridisierungen. Lediglich zwei von sechs Proben (Probe 88-1 und 90), die ein positives Kontroll-PCR Ergebnis zeigten, ergaben keine auswertbaren Chip-Hybridisierungen. Kürzere DNA-Fragmente korrelieren schlechter mit einem positiven Array-CGH-Ergebnis. Die konventionelle CGH-Technik hingegen stellt nicht so hohe Anforderungen an die DNA-Qualität, denn alle in der Übersicht aufgeführten Proben lieferten optimale CGH-Profile. Von den 11 hybridisierten Tumorproben verschiedener Patientinnen, konnten insgesamt sechs Array-CGH-Profile ausgewertet werden. Die übrigen fünf Tumorproben waren aus verschiedenen Gründen nicht auswertbar. Bei zwei Proben (Probe 54-1 und 93) war beispielsweise trotz ausreichender Signalintensitäten im Cy3- und Cy5-Kanal und wiederholter Hybridisierung die Streuung der Einzelwerte für eine verlässliche Auswertung zu hoch. Bei drei weiteren Proben (84, 88-1 und 90) wurden keine bzw. unspezifische Fluoreszenzsignale für die markierte Tumor-DNA im Cy3-Kanal festgestellt, während die Signalintensitäten für die Kontroll-DNA im Cy5-Kanal ausreichend waren.

### 3.7.2 Vergleich der Ergebnisse aus konventioneller und Array-CGH

Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der konventionellen und der Array-CGH. Durch die verbesserte Auflösung der Array-CGH konnten einzelne genetische Veränderungen, insbesondere Regionen mit Amplifikationen, näher eingengt und zusätzliche Aberrationen detektiert werden. Fokale Aberrationen, d. h. Veränderungen von nur einem BAC, konnten nicht

nachgewiesen werden und zwar auf Grund der deutlich höheren Standardabweichung der Log2-Werte des gesamten Genoms beim Paraffinmaterial im Vergleich zu nicht präamplifizierter genomischer DNA aus Zelllinien oder Lymphozyten (siehe Abbildung 3.7 und Tabelle 3.2). Als Aberrationen wurden nur über dem jeweiligen Grenzwert liegende Log2-Werte und mehrere aufeinander folgende veränderte BACs gewertet. Im Durchschnitt wurden bei den sechs ausgewerteten Tumorproben mittels Array-CGH 20 Aberrationen und mit der konventionellen CGH 11 Aberrationen pro Tumor detektiert. Die Anzahl und Art der einzelnen Veränderungen für die analysierten Proben ist in der folgenden Tabelle 3.13 zusammengefasst.

**Tabelle 3.13: Vergleich der Anzahl an Aberrationen zwischen konventioneller und Array-CGH an ausgewählten Proben**

*Von sechs verschiedenen Patientinnen mit DCIS ist die durch konventionelle CGH und Array-CGH ermittelte Anzahl an chromosomalen Zugewinnen, Verlusten, Amplifikationen, homozygoten Deletionen sowie die Gesamtzahl an Aberrationen gegenübergestellt. Es wurde die gleiche, durch Ligations-PCR amplifizierte Ausgangs-DNA für die Analysen eingesetzt.*

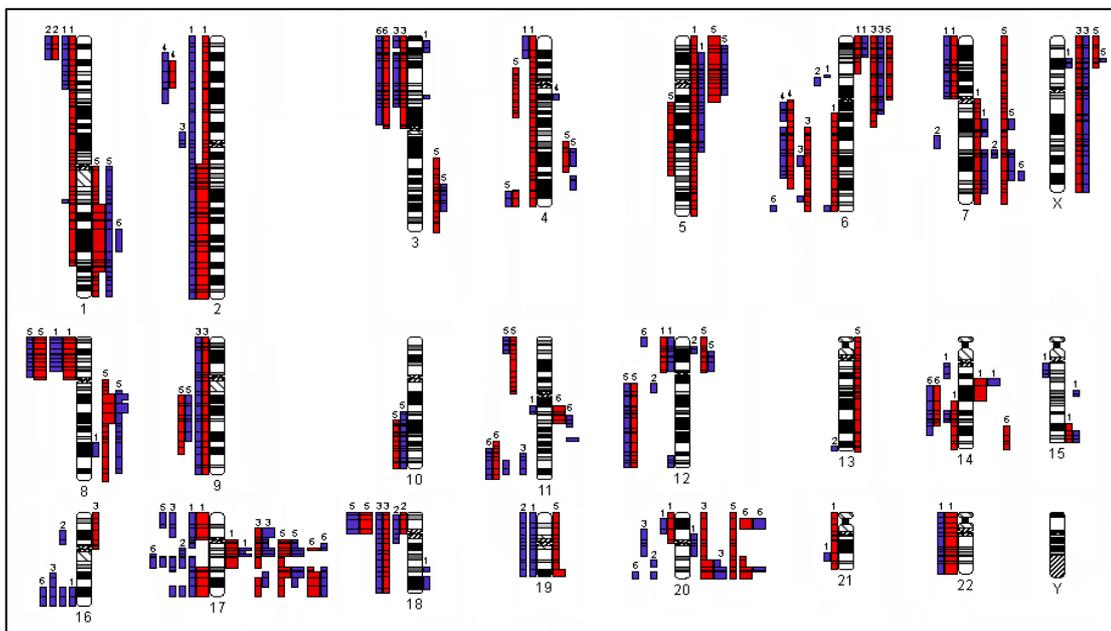
Probe	79-2		85		86		87		88-2		98	
	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH	konv. CGH	Array-CGH
Verlust	2	13	4	13	9	18	2	3	7	9	3	8
Zugewinn	0	2	6	5	4	16	0	1	9	11	3	5
Amplifikation	0	0	1	3	2	3	0	0	5	4	5	4
Homozygote Deletion	0	0	0	0	4	2	0	0	2	1	0	0
Summe	2	15	11	21	19	39	2	4	23	25	11	17

Auffallend ist, dass mit der Array-CGH durchschnittlich sechs Verluste und drei Zugewinne zusätzlich gefunden wurden. Homozygote Deletionen wurden in der konventionellen CGH häufiger detektiert, jedoch handelte es sich tatsächlich meist um den Verlust von nur einer Kopie einer chromosomalen Region, d. h. der Anteil homozygoter Verluste wurde in der konventionellen CGH überbewertet. Bereiche mit Amplifikationen stimmten zwischen beiden Methoden gut überein. Unterschiede kamen in erster Linie dadurch zustande, dass sich eine mit der konventionellen CGH gefundene Amplifikation mit der Array-CGH in zwei kleine separate Gipfel auflösen ließ, wie z. B. auf Chromosom 17q bei Probe 86 (siehe Abbildung 3.23).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine in der konventionellen CGH gewonnene Region, sich in der Array-CGH als Amplifikation nachweisen ließ oder sich eine amplifizierte Region in der Array-CGH nur als Zugewinn einer Kopie herausstellte. Ein Vergleich der detektierten Aberrationen beider Methoden ist in Abbildung 3.23

dargestellt (Die detaillierte Auflistung aller genetischen Veränderungen der analysierbaren Proben, einschließlich der die Aberrationen eingrenzenden Start- und Endklone sowie die Größe der aberranten Regionen befindet sich im Anhang unter 9.4).

Unterschiede zwischen beiden Methoden werden insbesondere an den Chromosomen 16, 17 und 20 deutlich. Keine der am Chromosom 16 in der telomerischen Region des langen Arms mit der Array-CGH detektierten Verluste (4 von 6 Tumorproben) wurde mit der konventionellen CGH gefunden. Auch nach erneuter Beurteilung der konventionellen CGH-Profile bestätigten sich die Veränderungen in Regionen der Telomere von Chromosom 16 nicht. Auf Chromosom 17 wurden bei 5 der 6 Tumore mit der Array-CGH Verluste meist größerer Regionen nachgewiesen und eine Übereinstimmung mit der konventionellen CGH auf Metaphasen zeigt sich nur für Tumor 86. Hier ist das gesamte Chromosom 17 bis auf die amplifizierte Region verloren (siehe Abbildung 3.23). Auf Grund der höheren Auflösung der Array-CGH wurde die Amplifikation auf Chromosom 17 deutlich eingengt. Am Beispiel des Tumors 88-2 wurden die Grenzen der konventionellen CGH besonders deutlich, da die zwei Amplifikationspeaks im Profil von 17q den Verlust der Region dazwischen und auch den Verlust von großen Teilen des p-Arms vollständig überlagerten.



**Abbildung 3.23: Vergleich der Ergebnisse aus konventioneller und Array-CGH**

Das Ideogramm zeigt schematisch alle Aberrationen der sechs analysierten Tumorproben. Die Array-CGH-Ergebnisse sind blau und die Ergebnisse der konventionellen CGH rot markiert. Die Balken rechts der Chromosomen repräsentieren Zugewinne und die Balken links davon Verluste genetischen Materials. Breite Balken rechts vom Ideogramm stehen für Amplifikationen und breite Balken links vom Ideogramm für homozygote Deletionen. Die Ziffern oberhalb der Balken kennzeichnen die jeweilige Tumorprobe, 1 = 86, 2 = 79-2, 3 = 85, 4 = 87, 5 = 88-2, 6 = 98. Das Umschreiben der aberranten Chromosomenbanden erfolgte mit dem Analyseprogramm CyDAS (siehe Kapitel 2.11.7).

### 3.7.3 Rekurrente Aberrationen und Regionen mit Amplifikationen

Die rekurrenten Aberrationen der sechs Tumorproben stimmten mit den schon in Kapitel 3.3.2 beschriebenen konventionellen CGH-Ergebnissen überein. Gemeinsame Veränderungen, die in mehr als zwei Tumoren (33 %) mittels Array-CGH-Technik detektiert wurden, waren Zugewinne auf 7q (4/6), Zugewinne bzw. Amplifikationen auf 17q (4/6), 20 q (3/6) und Verluste auf den Chromosomen 11q (3/6), 16qter (4/ 6), 17p (3/6), 17q (5/6) und 18p (3/6).

Um potentielle tumorrelevante Kandidatengene zu finden, sind gemeinsame aberrante Regionen mit minimaler Überlappung und auch kleinere Regionen mit einer Amplifikation von besonderem Interesse. Daher wurden aus den erhobenen Daten rekurrente Veränderungen und einzeln aufgetretene Amplifikationen zusammen mit Genen innerhalb dieser Regionen tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 3.14). Die Gene innerhalb der minimal überlappenden bzw. amplifizierten Regionen wurden aus dem UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) und dem „Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology“ (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer>) entnommen und einer Bewertung unterzogen.

Es wurden bei den sechs mit der Array-CGH untersuchten Tumorproben 10 unterschiedliche Regionen mit Amplifikationen, lokalisiert auf fünf verschiedenen Chromosomen (Chromosom 8, 11, 14, 17 und 20), identifiziert. Meist lagen 3 Amplifikationen (Probe 85 und 86) oder 4 Amplifikationen (Probe 88-2 und 98) pro Tumor vor. Bei den Proben 79-2 und 87 wurden mit beiden CGH-Techniken keine Amplifikationen nachgewiesen. Die Größe der kleinsten gemeinsamen amplifizierten Regionen lag zwischen 0,2 Mb und 9,9 Mb (Median 2,4 Mb) und die durchschnittliche Kopienzahl der Amplifikationen betrug 4 (zwei zusätzliche Kopien). Bei Tumor 86 war in der Region 14q12-q13.3 die Anzahl der Kopien mit 6 (4 zusätzliche Kopien) am höchsten. Der durchschnittliche Log<sub>2</sub>-Wert der amplifizierten BAC betrug 1,7. Viele der hier detektierten Zugewinne bzw. Amplifikationen auf 8q, 17q und 20q, einschließlich wichtiger Kandidatengene, gehören zu den häufigsten rekurrenten Amplifikationen beim Brustkrebs und sind bereits detailliert untersucht worden. Daher soll im Folgenden der Fokus auf die bereits erwähnte Amplifikation auf Chromosom 14 gerichtet werden.

**Tabelle 3.14: Mittels Array-CGH identifizierte rekurrente Aberrationen mit minimaler Überlappung und Amplifikationen**

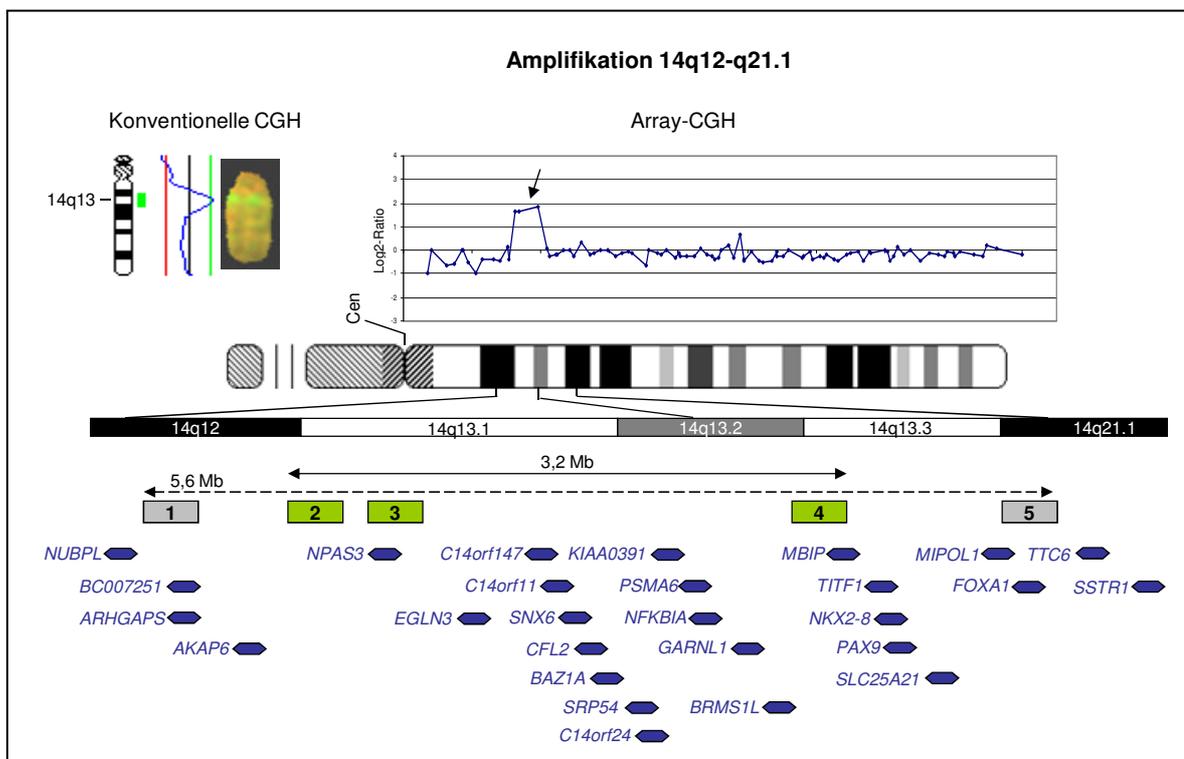
Rekurrente Aberrationen	Region/ Größe [Mb]	Tumor-ID	Gene innerhalb der minimal überlappenden Region
enh(7q31.1)	109,8-111,1 (1,3)	79-2, 86, 88-2	<i>CBLL1, PPP1R3A, CAV1, CAV2, ST7, TES</i>
amp(8q11.2-q12.1)x4 *	55,4-57,8 (2,4)	88-2	<i>TCEA1, LYN, MOS, PLAG1</i>
amp(8q12.1-q13.2)x4 *	60,8-69,3 (8,5)	88-2	<i>RAB2, ASPH, CYP7B1, TRIM55</i>
amp(11q21)x4 *	93,8-96,2 (2,4)	98	<i>MRE11A, PIG8, MAML2</i>
dim(11q23.3-q24.2)	118,2-126,5 (8,3)	85, 88-2, 98	<i>DDX6, BLR1, BCL9L, HYOU1, H2AFX, CBL, MCAM, RNF26, C1QTNF5, TRIM29, ARHGEF12, HSPA8, LOH11CR2A, TBRG1, SPA17, FEZ1, EI24, CHEK1, CDON, SRPR</i>
amp(14q12-q13.3)x6 *	31,3-34,5 (3,2)	86	<i>SNX6</i>
dim(14q23.3-q24.2)	63,1-68,5 (5,4)	86, 98	<i>ESR2, HSPA2, SPTB, MAX, FUT8, MPP5, RDH11, RAD51L1, ZFP36L1, WDR22</i>
dim(16q23.3-qter)	82,3-89,8 (7,5)	79-2, 85, 86, 98	<i>MBTPS1, WFDC1, FOXF1, SLC7A5, IL17C, CBFA2T3, CBFA2T3, CDH15, ANKRD11, SPG7, RPL13, CPNE7, CDK10, FANCA, MC1R, GAS8, PRDM7</i>
amp(17p11.2)x5 *	19,3-20,3 (1,0)	85	<i>MAPK7, ALDH3A1, AKAP10, MAP2K3</i>
enh(17q11.2-q12)	30,6-35,3 (4,7)	85, 88-2, 98	<i>FLJ10260, TAF15, CCL14, CCL15, CCL3, CCL4, AATF, TADA2L, DUSP14, AP1GBP1, TBC1D3, MLLT6, PCGF2, RPL23, LASP1, PLXDC1, PPARBP, STARD3, TCAP, ERBB2</i>
amp(17q12-q21.2)	37,1-38,8 (1,7)	85, 86, 88-2	<i>SUI1, JUP, LGP2, GCN5L2, RAB5C, LGP1, STAT5B, STAT5A, STAT3, ATP6V0A1, HSD17B1, BECN1</i>
amp(17q21.2)	39,1-39,4 (0,3)	85T, 86T	<i>DUSP3, MPP3, MPP2</i>
dim(17q21.2-q21.31)	39,4-42,0 (2,6)	79-2, 85, 86, 88-2, 98	<i>SLC4A1, ITGA2B, ADAM11, MAP3K14, MAPT, WNT3</i>
enh/amp(17q23.3-q24.2)	62,1-64,8 (2,7)	85, 88-2**, 98	<i>FALZ, KPNA2, PRKAR1A, MAP2K6</i>
dim(18p11.31-p11.21)	3,4-14,9 (11,5)	79-2, 85, 88-2	<i>MYOM1, EPB41L3, PTPRM, RALBP1, RAB31, APCDD1, CIDEA, TNFSF5IP1, PTPN2</i>
amp(20p12.2-p12.1)x4 *	9,2-16,6 (7,4)	98	<i>PLCB1, JAG1, C20orf38, OTOR</i>
amp(20q13.2-q13.33)	50,8-60,7 (9,9)	85, 98	<i>BCAS4, ADNP, ZNF217, BCAS1, CYP24A1, STK6, TFAP2C, BMP7, TMEPAI, RAB22A, GNAS, CTSZ, CDH4, SS18L1, SS18L1, ADRM1</i>

\* Anzahl der Kopien bei Vorliegen einer Amplifikation einzelner Tumoren, ermittelt aus den jeweiligen Grenzwerten für Zugewinne und Verluste; \*\* Vorliegen einer Amplifikation in dieser Region

### 3.7.4 Untersuchung der Amplifikation 14q12-q21

Bei vier mittels konventioneller CGH analysierter Tumorproben von 3 der 23 DCIS-Patientinnen (Frequenz 13 %) war die Region 14q12-q13.3 amplifiziert (siehe Abbildung 3.10). Bei zwei LCIS-Patientinnen und einer Patientin mit einem IDC war die Region mit einer zusätzlichen Kopie gewonnen und bei einer IDC-Patientin war der Bereich ebenfalls amplifiziert.

Mit der Array-CGH wurde diese Amplifikation am Tumor 86 (DCIS) näher untersucht. Das Amplikon 14q12-q13.3 umfasste 3,2 Mb und zusammen mit den beiden nächsten proximal und distal zur Amplifikation gelegen nicht veränderten BACs ergab sich eine Größe von insgesamt 5,6 Mb (14q12-q21.1). Wegen der bereits erwähnten hohen Kopienzahl von sechs Kopien war die Lokalisation der Amplifikation auch mittels konventioneller CGH recht genau zu bestimmen und wurde für die Region 14q13-q21 (Amplifikationsmaximum 14q13) bestimmt. Mit der Array-CGH-Technik ließ sich die genomische Position anhand der veränderten BACs noch exakter eingrenzen. In Abbildung 3.24 sind sowohl die Amplifikation als auch alle Gene der Region schematisch dargestellt. Innerhalb des 3,2 Mb großen amplifizierten Bereiches sind zirka 15 Gene und zusammen mit den beiden diese Region flankierenden BACs etwa 24 Gene lokalisiert. Die gefundenen Gene sind potentielle Onkogen-Kandidaten, die bei biologischen Prozessen zur Entstehung von Brustkrebs eine Rolle spielen.



**Abbildung 3.24: Amplifikation von 14q12-q21.1 am Beispiel eines DCIS**

Hybridisierung von Tumorprobe 86 auf Metaphasechromosomen und auf einen DNA-Chip. Dargestellt sind die CGH-Profile aus konventioneller- und Array-CGH von Chromosom 14 einschließlich des Amplifikationspeaks bei ansonsten unverändertem Profil sowie die innerhalb des Amplikons lokalisierten Gene.

Die grünen Kästchen entsprechen den drei BACs innerhalb der Amplifikation. Durch die grauen Kästchen werden die die Amplifikation flankierenden Klone markiert. Die Bezeichnung der Klone ist wie folgt: 1) RP11-187E13; 2) RP11-501E21; 3) RP11-114L8; 4) RP11-259K8; 5) RP11-356O9. Alle Gene (blau) innerhalb der amplifizierten Region, deren Lokalisation zueinander und zu den BACs wurden in Anlehnung an den UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) übernommen. Das Ideogramm entspricht dem 850-Banden-Format nach ISCN.

### **3.8 Generierung lokusspezifischer FISH-Sonden zur Brustkrebsdiagnostik**

Die Auswahl geeigneter BACs zur Generierung von FISH-Sonden für die Interphasezytogenetik multipler Loci zur Identifizierung von Tumorzellen basierte auf bereits publizierten CGH-Ergebnissen und den in Kapitel 3.3 aufgeführten eigenen CGH-Ergebnissen von Vorläuferläsionen und invasiven Karzinomen. Zur Generierung eines SONDENSETS für acht ausgewählte Tumorregionen wurden Chromosomenabschnitte berücksichtigt, die häufig Zugewinne und Verluste zeigen. Als interne Kontrollen wurden Zentromersonden für Chromosom 2 und 4 gewählt, die in den untersuchten Tumoren häufig disom waren. Die verwendeten BACs, deren Lokalisation im Genom und tumorrelevante Gene innerhalb der Regionen sind in Kapitel 2.12.3 beschrieben und in Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7 dokumentiert.

#### **3.8.1 Methodische Aspekte zur optimalen FISH-Diagnostik**

Für diagnostische Anwendungen von FISH-Sonden ist eine optimale Hybridisierung mit hohen Signalintensitäten und geringem Hintergrund essenziell. Im Folgenden werden die aus Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse zur Optimierung zusammengefasst.

Zur Verstärkung der Signalintensitäten war es von Vorteil, statt eines Einzelklons drei im Genom benachbarte und in ihrer Sequenz überlappende BACs als Pool einzusetzen. Eine Kombination von mehr als drei Klonen bewirkte keine weitere Verstärkung des Signals und führte eher zu einem ungünstigen Verhältnis von Signal- zu Kerngröße. Weiterhin hatte sich gezeigt, dass zur DNA-Markierung mit direkten und indirekten Fluoreszenzfarbstoffen die klassische Nick Translation anderen Methoden wie z. B. der Markierung durch DOP-PCR, Random Priming oder chemischer Methoden überlegen war. Entweder waren die Signalintensitäten schwächer als bei der Nick Translation oder die störende Hintergrundfluoreszenz war zu stark. Wichtig war, dass durch die richtige Wahl der DNase-Aktivität während der Nick Translation die DNA-Fragmente mit einer optimalen Länge zwischen 300 und 600 bp generiert wurden, da sonst die Signalintensität für ein sicheres Auszählen der FISH-Signale zu schwach oder die Hintergrundfluoreszenz zu hoch wurde. Für den grünen Fluoreszenzbereich lieferte die indirekte Markierung der DNA-Fragmente durch Biotin-dUTP und der anschließenden Detektion mit Avidin-FITC das beste Ergebnis. Im roten

Spektralbereich brachte die direkte Markierung mit Tamra-dUTP deutliche Vorteile gegenüber einer indirekten Markierung. Für den Spektralbereich nahe dem Infrarot wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy5 verwendet. Hier wiederum führte eine indirekte Markierung über an Antikörper gekoppeltes Cy5 zu einer deutlichen Verstärkung der Signalintensitäten. Eine zuverlässige Auswertung nach Direktmarkierung mit Cy5-dUTP war auf Grund der schwachen Signale nicht möglich. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden pro Hybridisierung drei unterschiedlich markierte Sonden, zwei tumorspezifische Sonden, jeweils aus drei überlappenden BACs bestehend und eine Zentromersonde als interne Kontrolle miteinander kombiniert.

### **3.8.2 Interphase-FISH- und CGH-Ergebnisse im Vergleich**

Es wurden insgesamt acht unterschiedliche tumorspezifische FISH-Sonden und zwei kommerzielle Zentromersonden jeweils an verschiedenen Tumorpräparaten wie Imprints, Zytospinpräparaten, Gewebeschnitten und für Kontrollzwecke an Lymphozyten und an Schnitten von normalem Brustgewebe getestet. Die Ergebnisse der Auszählung von Interphase-FISH-Signalen werden in Tabelle 3.15 zusammengefasst und mit dem Ergebnis der CGH-Analyse verglichen. Für jedes Präparat wurden die FISH-Signale jeder Sonde in 200 Zellkernen bestimmt und der Medianwert pro Zellkern ermittelt. Der Median charakterisiert, ähnlich wie die CGH-Analyse, gemessene Zellen der Tumorregion insgesamt und berücksichtigt nicht spezifische Aberrationsmuster unterschiedlicher Zellklone. Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Methoden beruhen sicher z. T. darauf, dass unterschiedliche Subpopulationen desselben Tumors gemessen wurden (Intra-Tumor-Heterogenität). Insgesamt zeigt die FISH-Analyse jedoch eine deutlich höhere Anzahl von Proben mit Aberrationen als die CGH-Analyse (gepaarter Wilcoxon-Test;  $p = 0,020$ ), also eine höhere Detektionssensitivität (siehe Tabelle 3.15). Im Folgenden werden die Hybridisierungsergebnisse aus Tabelle 3.15 im Einzelnen beschrieben.

#### **3.8.2.1 FISH an Kontrollpräparaten**

Zur Beurteilung der Sondenqualität wurde in jedem Experiment auch eine Hybridisierung auf Präparate von normalen Lymphozyten durchgeführt (XX-Lym, Tabelle 3.15). Dabei lag die Hybridisierungseffizienz, definiert als Prozentsatz von Zellen mit zwei Signalen, für alle acht selbst generierten, lokusspezifischen Sonden im Median bei 97 % (87-99 %) und für die kommerziellen Zentromersonden ebenfalls bei 97 % (96-98 %). Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz zwischen FITC-, Tamra- bzw. Cy5-markierten Sonden wurden nicht festgestellt, auch wenn im Cy5-Kanal die Hintergrundfluoreszenz meist etwas höher lag als im FITC- und Tamra-Kanal.

**Tabelle 3.15: Interphase-FISH- und CGH-Ergebnisse im Vergleich**

Pro Sonde wurden die Signale von 200 Interphasekernen ausgezählt und der Medianwert der Signale pro Zelle ermittelt. Diese Medianwerte entsprechen den Zahlen in den Kästchen, die Buchstaben repräsentieren das CGH-Ergebnis von DNA derselben Probe. Grau: normal (N) bzw. 2 Signale, Hellgrün: Zugewinn (G) bzw. 3 Signale, Grün: Amplifikation (A) bzw. > 3 Signale, Rot: Verlust (V) bzw. < 2 Signale. Die mit e, f, und g markierten Analysen (schraffierte Kästchen) zeigen Subpopulationen mit (e) 3 Signalen (35 %), (f) 1 Signal (44 % und (g) 1 Signal (25 %) pro Zellkern.

Proben-ID	1q32		8q24		10q23		11q13		16q22		17p13		17q12		20q13		CEP-2		CEP-4	
	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH	FISH	CGH
XX-Lym <sup>a</sup>	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N
XX-FFPE <sup>b</sup>	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N		N	2	N		N	-	N	2	N
FM-1-Imp <sup>c</sup>	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2	
FM-2-Imp	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2	
FM-3-Imp	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2	
FM-4-Imp	2		2		2		2		2		2		2		2		-		2	
63-DCIS-FFPE		N	2 <sup>e</sup>	G	2	N	2	N	2 <sup>f</sup>	V		V		G		N		N	2	N
DCIS-Imp *	3	N	2	N	2	N	2	N	1	N	2	N	2	N	2	N	2	N	2	N
DCIS-FNA *	3	N		N		N		N		N	2	N	2	N	2	N	2	N		N
1-IDC-Imp	6	A	-	N	-	N	-	N	-	V	3	N	3	G	3	N	4	N	-	N
2-IDC-Imp	3	A	6	A	2	N	2	N	1	V	1	V	2	N	4	A	2	N	2	N
3-IDC-Imp	4	A	3	G	3	N	3	N	2 <sup>g</sup>	V	2	N	2	N	3	N	3	N	2	N
6-ILC-Imp	2	N	2	N	2	N	2	N	1	N	1	N	2	N	2	N	2	N	2	N
131-IDC-Imp	7	A	6	G	5	N	11	N	7	N	4	V	21	A	7	N	4	G	6	A
Anz. v. Proben mit Aberr. <sup>d</sup>	6	4	3	4	2	0	2	0	4	3	4	2	2	2	4	1	3	1	1	1

<sup>a</sup>XX-Lym = weibliches Lymphozytenpräparat und <sup>b</sup>XX-FFPE = Schnittpräparat von normalem Brustgewebe aus Paraffinmaterial zur Kontrolle, <sup>c</sup>FM = fibrozystische Mastopathie, Imp = Imprintpräparat, FNA = Zytospinpräparat nach simulierter Feinnadelaspiration (FNA), FFPE = formalinfiziertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe, (-) nicht auswertbar, leeres Kästchen: keine Hybridisierung bzw. Messung durchgeführt, (\*) Proben desselben Tumors. <sup>d</sup> Es wurden nur Tumorproben berücksichtigt, die sowohl mit FISH als auch mit CGH analysiert wurden.

Die Hybridisierung auf Gewebeschnitte und deren Auswertung erwies sich oft als schwierig. Häufig lösten sich die Schnitte während der Vorbehandlung oder nach der Hybridisierung bei den Waschschriffen vom Objektträger ab. Das Auszählen wurde durch überlagerte Kerne und relativ hohe Hintergrundfluoreszenz erschwert. Außerdem war, durch das Anschneiden des Gewebes bedingt, der Prozentsatz von Kernen mit nur einem Signal in normalem Brustgewebe mit 20 % (Spanne 15-30 % bei Probe XX-FFPE) sehr hoch. Der Prozentsatz von Kernen mit zwei Signalen betrug daher nur 73 % (66-78 %). Bei wenigen Zellen (7 %) wurden keine Signale (2,5-6 %), drei Signale (1-3 %) oder vier Signale (0-1 %) ausgezählt (Schnitt- oder Messartefakte oder S- und G<sub>2</sub>/ M-Phasen-Zellen). Kerne ohne FITC-, Tamra- und Cy5- Signale wurden nicht analysiert.

#### 3.8.2.2 FISH an Präparaten mit fibrozystischen Mastopathien

Nach Hybridisierung aller Sonden auf Imprintpräparate von vier fibrozystischen Mastopathien wurden in keiner der Regionen Veränderungen gefunden (FM-1 bis FM-4, Tabelle 3.15). Gemittelt über alle vier Präparate und für alle acht Sonden hatten 91 % der Zellkerne zwei Signale, was der oben erwähnten Hybridisierungseffizienz für normale Lymphozyten nahe kommt. Es wurden keine Hinweise auf genetisch veränderte Zellen gefunden. Eine CGH-Analyse von Gewebeproben dieser Patientinnen wurde nicht durchgeführt.

#### 3.8.2.3 FISH am Gewebeschnitt eines DCIS (Pat.-ID 63)

Für alle lokus- und zentromerspezifischen Sonden wurden durchschnittlich zwei Signale pro Kern ermittelt. Unterschiede zu den CGH-Ergebnissen gab es für die Regionen 8q24 und 16q22. Bei genauerer Betrachtung der FISH-Ergebnisse für 8q24 wurde festgestellt, dass im Median zwar zwei Signale pro Kern (36 %) ermittelt wurden, aber auch Zellen mit drei Signalen mit etwa gleich hoher Frequenz (35 %) auftraten, was den mit CGH gefundenen Zugewinn bestätigt. Ähnlich verhielt es sich mit der Region 16q22. Es wurden 47 % Kerne mit zwei Signalen und 44 % Zellen mit nur einem Signal ermittelt, was ebenfalls das mittels CGH-Analyse gefundene Ergebnis (Verlust der Region 16q22) bestätigt. Offensichtlich existieren unterschiedliche Zellpopulationen mit separaten Aberrationsmustern.

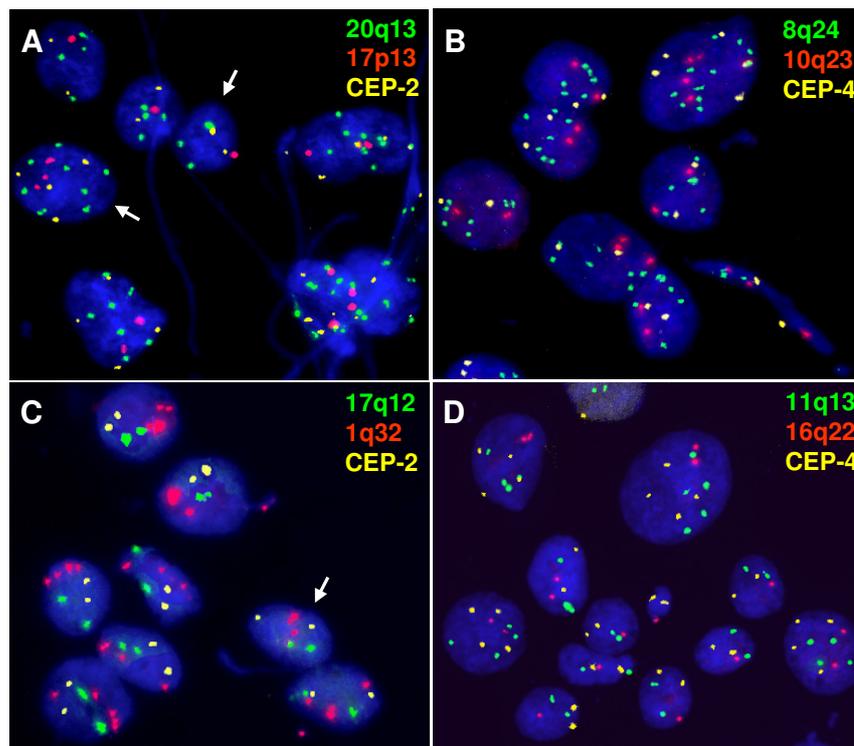
#### 3.8.2.4 FISH am Imprint und Feinnadelaspirat des gleichen Tumors

Die durchschnittliche Anzahl an Signalen pro Interphasekern stimmte zwischen dem Imprint und Feinnadelaspirat, hergestellt aus dem gleichen OP-Material einer Patientin mit einem DCIS, vollständig überein (Probe DCIS-Imp und DCIS-FNA, Tabelle 3.15). Die Hybridisierungseffizienz der generierten FISH-Sonden betrug beim Imprint 86 % und beim Feinnadelaspirat 87 %, ohne Berücksichtigung der 1q32-Sonde (> 2 Signale

bei 53 % der Kerne am Imprint und 69 % beim Aspirat) und der Sonde für die Bande 16q22 (< 2 Signale bei 59 % der Zellen beim Imprint; auf das Aspirat wurde die Sonde nicht hybridisiert). Durch CGH-Analyse wurde der Verlust von 16q22 nicht erfasst. Die im CGH-Profil sehr deutlich sichtbare Amplifikation auf der weiter telomerisch gelegenen Bande 17q22 (CGH-Profil nicht gezeigt), wurde mit der Sonde für 17q12-q21 nicht mehr detektiert.

### 3.8.2.5 FISH an invasiven Karzinomen

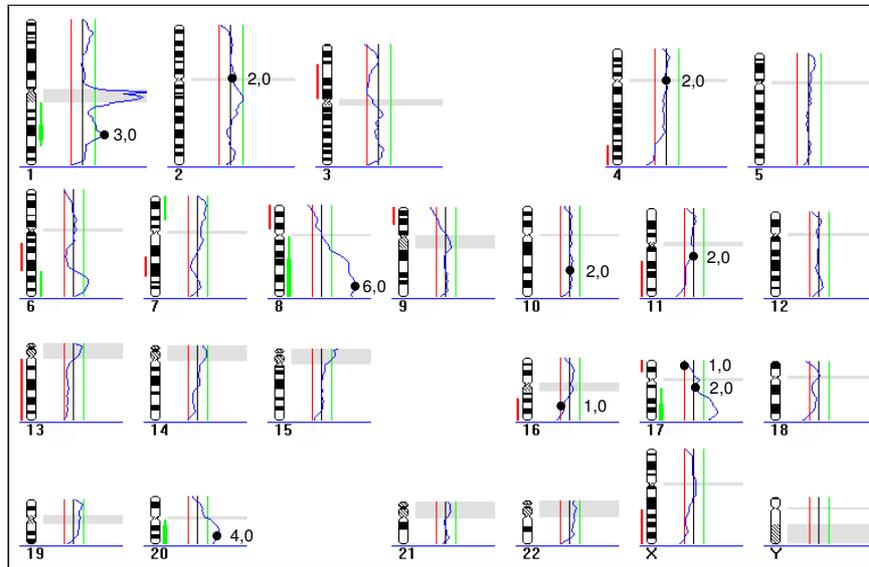
Beim Präparat des Tumors 2-IDC stimmten die ermittelten Interphase-FISH-Ergebnisse mit denen aus der CGH-Analyse überein (siehe Tabelle 3.15). Die Grenzen der Interphasezytogenetik, bedingt durch die limitierte Anzahl eingesetzter Sonden, sind z. B. am Chromosom 17 zu sehen. Während die Region für *HER-2/neu* mit beiden Methoden als unverändert beurteilt wurde, konnte der mittels CGH gefundene Zugewinn für die Region 17q22-qter bzw. die Amplifikation im Bereich 17q24-qter ebenso wie die mit der CGH sichtbaren Aberrationen auf den Chromosomen 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, und X mit Interphase-FISH nicht detektiert werden (siehe Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.25: Hybridisierung des FISH-Sondensets auf Interphasekerne eines invasiv duktales Karzinoms (IDC)**

*Hybridisierung des FISH-Sondensets auf Interphasekerne eines hoch aberranten IDC (Probe 2-IDC). Pro Hybridisierungsareal wurden drei unterschiedlich markierte Sonden miteinander kombiniert. (A) Sondenkombination 1, (B) Kombination 2, (C) Kombination 3, (D) Kombination 4. Die Anzahl grüner, roter und gelber Signale entspricht weitestgehend den in Tabelle 3.15*

gezeigten Medianwerten. Neben Tumorzellen mit unterschiedlichen Aberrationsmustern (Pfeile in A) gibt es auch normale diploide Zellen (Pfeil in Bild C). Die Pfeile in A markieren eine diploide Zelle mit einem Zugewinn auf 20q13 (3 grüne Signale) und einem Verlust auf 17p13 (1 rotes Signal) sowie eine größere Tumorzelle mit doppeltem Chromosomensatz (4 Signale für Zentromer 2), ebenfalls mit einem Zugewinn auf 20q13 (8 grüne Signale) und einem Verlust auf 17p13 (3 rote Signale).



**Abbildung 3.26: CGH-Profil und Ergebnis der Interphase-FISH am gleichen IDC**

CGH-Profil und FISH-Ergebnis von Tumorprobe 2-IDC nach Anwendung des in Tabelle 2.7 definierten FISH-Sondensets. Die schwarzen Punkte im CGH-Profil zeigen die Lokalisation der acht FISH-Sonden, die wichtige Tumorregionen markieren, einschließlich der kommerziellen Kontrollsonden für die Zentromere der Chromosomen 2 und 4. Die daneben stehenden Zahlen entsprechen jeweils dem Medianwert der in 200 Zellen ausgezählten Fluoreszenzsignale (Vorliegen von 2 Signalen = normal (Disomie), Vorliegen von < 2 oder > 2 Signalen pro Zelle (Aneusomie) wie z. B. Monosomie, Trisomie, Tetrasomie). In den Genombereichen des Sondensets stimmten Interphase-FISH- und CGH-Ergebnisse völlig überein. Die höchste Anzahl an Signalen pro Interphasekern wurde mit durchschnittlich 6 Kopien für die Tumorregion 8q24 ermittelt, in der auch das CGH-Profil den stärksten Zugewinn zeigt. Rote Balken: Verluste, grüne Balken: Zugewinne, dicke grüne Balken: Amplifikationen.

Bei den anderen analysierten invasiven Tumoren gab es z. T. mehrere Abweichungen zwischen dem CGH- und Interphase-FISH-Ergebnis. So wurden bei Tumor 1-IDC für die Regionen 17p13, 20q13 und für Zentromer 2 mit Interphase-FISH Zugewinne gefunden, die mittels CGH nicht detektiert wurden.

Bei Tumor 3-IDC ist die Situation ähnlich. In vier Regionen wurde durch Interphase-FISH ein Zugewinn (jeweils durchschnittlich drei Signale pro Kern) gefunden, aber nicht mittels CGH. Bei dem in der CGH gefundenen Verlust auf 16q22 wurden nach FISH-Analyse zwar durchschnittlich zwei Signale pro Kern, aber auch ein relativ hoher Anteil an Kernen mit weniger als zwei Signalen (26 %) ermittelt, so dass die

Ergebnisse als übereinstimmend betrachtet werden müssen. Die Amplifikation auf 1q32 und der Zugewinn auf 8q24 wurden durch beide Methoden nachgewiesen.

Beide in Probe 6-ILC durch FISH gefundenen Verluste in den Regionen 16q22 und 17p13 waren eindeutig, denn 83 % (16q22) und 94 % (17p13) aller Zellen hatten weniger als zwei Signale. In den CGH-Profilen wurden bei diesen Chromosomenbanden keine Verluste festgestellt.

Besonders deutlich waren die Diskrepanzen bei Probe 131-IDC. Einige hoch amplifizierte Regionen, wie z. B. 11q13 (11 Kopien) und 20q13 (sieben Kopien) wurden mittels CGH-Analyse nicht als Zugewinn oder Amplifikation nachgewiesen. Wahrscheinlich ist der gesamte Tumor polyploid mit sehr heterogenen, hoch komplexen Aberrationen und möglicherweise wurden mit den beiden Methoden unterschiedliche Subpopulationen untersucht (Intra-Tumor-Heterogenität). Für die Region 17q12 (Nachweis auch durch CGH) wurden im Median 21 Signale (Spanne 12 bis 32 Signale) pro Kern ermittelt, die meist clusterartig zusammengelagert waren und sich daher schwer bewerten ließen. Das entspricht der höchsten Signalzahl pro Kern aller hier analysierten Proben überhaupt. Durch CGH-Analyse wurden genomweit 25 Aberrationen, davon 15 Zugewinne und 20 Verluste auf verschiedenen Chromosomenabschnitten gefunden.

### 3.8.3 Sensitivität des generierten FISH-Sondensets zur Diagnostik

Um zu klären, inwieweit die genetischen Marker geeignet sind, Patientinnen mit Brustkrebs und unabhängig von der Tumorphistologie zu identifizieren, wurde unter der Annahme, dass sich die mittels CGH nachgewiesenen Zugewinne und Verluste auch durch FISH nachweisen lassen, anhand der eigenen CGH-Ergebnisse geprüft, in welchen der insgesamt zehn Regionen, bestehend aus acht Tumorregionen und zwei Zentromerregionen (CEP-2 und CEP-4), Zugewinne und Verluste aufgetreten sind.

Sieben von 61 Patientinnen, darunter fünf Patientinnen mit einer ADH (44-ADH, 101-ADH, 103-ADH, 108-ADH, 110-ADH) und 2 Patientinnen mit einem ILC (6-ILC, 7-ILC), zeigten keine Veränderungen im CGH-Profil. Von den verbleibenden 54 Patientinnen wurden vier Patientinnen (65-ADH, 79-DCIS-G1, 87-DCIS-G2 und 9-ILC) ermittelt, die zwar Veränderungen im CGH-Profil zeigten (1 bis maximal 2 Aberrationen), welche aber nicht in die Chromosomenabschnitte der FISH-Sonden kartierten. Das bedeutet, dass mit Hilfe der FISH-Sonden bei diesen Patientinnen (insgesamt elf Patientinnen) kein Brustkrebs diagnostiziert worden wäre. Daraus ergibt sich eine Detektionsrate von insgesamt 82 %, alle der hier analysierten Läsionen durch das FISH-Sondenset zu erfassen. Unter ausschließlicher Berücksichtigung von Brusttumoren, also aller invasiven Karzinome und der *in situ*-Karzinome ohne ADH, steigt die Sensitivität auf 90 % an. In der folgenden Tabelle 3.16 sind die Ergebnisse für die einzelnen Tumorgruppen aufgeschlüsselt. Die Detektionsraten über alle Sonden, ohne Einbeziehung der ADH, liegen zwischen 40 und 100 % und für eine einzelne Sondenregion zwischen 14 % (10q23 und 11q13) und 75 % (1q32). Da es

sich bei den ADH um Vorläuferläsionen handelt, wurden die Detektionsraten gesondert berechnet.

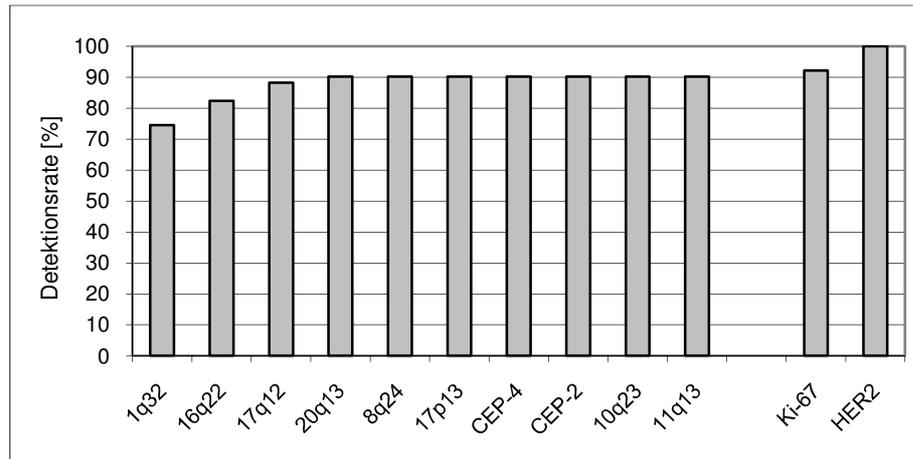
Die separate Verwendung der 1q32-DNA-Sonde erlaubt eine Detektionsrate von 75 % der hier analysierten Brusttumore. Unter Einbeziehung der Sonde 16q22 ließe sich die Detektionsrate auf 82 % erhöhen und bei zusätzlicher Berücksichtigung der Sonden für 17q12 und 20q13 würden 90 % der Tumore detektiert werden. Jede weitere FISH-Sonde aus dem Set hätte keinen zusätzlichen Tumor identifiziert. In Kombination mit immunhistochemischen Parametern könnte die Detektionsrate der analysierten Brusttumore von 90 % auf 100 % erhöht werden (siehe Abbildung 3.27). Unter Einbeziehung der ADH wären es noch 92 %.

**Tabelle 3.16: Aberrationsfrequenz der im Sondenset definierten Regionen**

Durch CGH-Analyse wurde die Aberrationsfrequenz [%] der im Sondenset eingeschlossenen Loci für 51 Brustkrebspatientinnen (invasive Karzinome und in situ-Karzinome) und für zehn Patientinnen mit einer ADH ermittelt. Mit Hilfe aller zehn Sonden ließen sich bezogen auf die eigenen CGH-Daten z. B. alle Patientinnen mit einem LCIS und 91 % der Patientinnen mit einem DCIS identifizieren. Durch die 1q32-Sonde allein könnten bereits 75 % aller Brusttumore erfasst werden.

Histologie	Alle Sonden	1q32	8q24	10q23	11q13	16q22	17p13	17q12	20q13	CEP-2	CEP-4
<b>Pat. mit ADH [10]</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>10</b>
DCIS Grad 1 [4]	<b>75</b>	50	50	50	0	75	25	25	25	25	0
DCIS Grad 2 [9]	<b>89</b>	33	33	22	22	44	44	56	44	0	11
DCIS Grad 3 [10]	<b>100</b>	100	50	20	0	30	50	80	40	40	20
DCIS gesamt [23]	<b>91</b>	65	43	26	9	43	43	61	39	22	13
LCIS [15]	<b>100</b>	87	27	7	27	73	13	40	33	0	13
IDC [7]	<b>100</b>	100	43	0	0	71	43	43	43	14	14
ILC [6]	<b>50</b>	50	0	0	17	17	0	0	0	0	0
<b>Pat. gesamt [51]</b>	<b>90</b>	<b>75</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>53</b>	<b>31</b>	<b>41</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>20</b>

[n] = Anzahl der Patientinnen innerhalb der Tumorguppen. Jede Patientin wurde nur einmal berücksichtigt und Patientinnen mit einer atypisch dukalen Hyperplasie getrennt berechnet.



**Abbildung 3.27: Detektion von Brustkrebs in Abhängigkeit von der Anzahl eingesetzter FISH-Sonden und zusätzlicher immunhistochemischer Marker**

*Durch Hybridisierung der ersten vier FISH-Sonden (siehe X-Achse) können 90 % aller Brusttumore (ohne Berücksichtigung von ADH) identifiziert werden. Die Anwendung zusätzlicher FISH-Sonden brächte keinen weiteren Vorteil. Durch zusätzliche Bestimmung immunhistochemischer Parameter könnte die Detektionsrate auf 100 % gesteigert werden. Gewertet wurden Fälle mit einer Proliferationsrate (Ki-67) von > 10 % und positivem HER-2/neu Score.*

## 4 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der molekularzytogenetischen Analyse früher Brustkrebsstadien zur Detektion chromosomaler Imbalancen mit Hilfe der CGH-Technik. Die Analysen erfolgten retrospektiv an formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Geweben von zehn Patientinnen mit einer atypischen duktalem Hyperplasie (ADH), 23 Patientinnen mit einem duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) und 15 Patientinnen mit einem lobulärem Carcinoma *in situ* (LCIS). Zusätzlich wurden sieben Patientinnen mit invasiv duktalem (IDC) und sechs Patientinnen mit invasiv lobulärem Karzinom (ILC) untersucht.

Zu Beginn der Studie waren vorwiegend CGH-Daten zum invasiven Mammakarzinom und nur vereinzelt zu *in situ*-Karzinomen oder atypisch duktalem Hyperplasien verfügbar. Dies hat hauptsächlich methodische Gründe, da die genomische DNA aus Tumorzellen invasiver Karzinome relativ einfach aus ganzen Gewebeschnitten, meist mittels Phenol-Chloroform-Extraktion, gewonnen wurde und genügend Ausgangs-DNA für die CGH-Analyse zur Verfügung stand. Um auch bei frühen, häufig nur wenige Millimeter großen Brustläsionen eine exakte Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu ermöglichen, war es notwendig, Zellen definierter Morphologie durch Lasermikrodissektion zu separieren und die gewonnene DNA in einem Amplifikationsschritt zu vervielfältigen.

Basierend auf den CGH-Ergebnissen und unter Einbeziehung von Daten aus der Literatur sollten prognostische Marker in Form eines FISH-Sondensets zur Detektion von Brustkrebs und zur Subklassifizierung verschiedener Tumorstadien generiert werden. Im ersten Schritt mussten methodische Fragen zur Amplifikation und Markierung von fixierter genomischer DNA aus laser-mikrodisseziertem Gewebe geklärt und diese Techniken auf ihre Anwendbarkeit an Metaphasechromosomen (konventionelle CGH-Analyse) und DNA-Chips (hochauflösende Array-CGH-Analyse) überprüft werden. Im nächsten Schritt erfolgte die CGH-Analyse an den oben beschriebenen Brustkrebsstadien. Die Ergebnisse wurden anhand ähnlicher genetischer Veränderungen und unabhängig vom histologischen Typ zu Gruppen zusammengefasst (Clusteranalyse) und auch mit immunhistochemischen Daten wie z. B. ER, PgR, Ki-67 und HER-2/neu korreliert. Zum Schluss wurden für ausgewählte genomische Regionen mit rekurrenten Aberrationen mehrfarbige FISH-Sonden generiert und diese auf Interphasekerne von Abklatschpräparaten (Imprints), Feinnadelaspiraten und Gewebeschnitten hybridisiert. Die Einsatzmöglichkeiten des FISH-Sondensets zur Brustkrebsdiagnostik sowie deren Vorteile, Nachteile und Grenzen werden diskutiert.

## 4.1 Methoden zur Amplifikation und Markierung genomischer DNA an formalinfixiertem Gewebe

Ein Problem bei der retrospektiven Analyse von Tumoren aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Geweben (Archivmaterial) besteht darin, dass die gewonnene DNA durch die Fixierung meist degradiert und auf Grund der sehr geringen Mengen an Ausgangs-DNA eine Amplifikation zur weiteren Bearbeitung erforderlich ist. Dies kann zur Beeinträchtigung des Ergebnisses führen, indem die Messwerte im CGH-Profil stark streuen und genomische Veränderungen nicht sicher bestimmt werden können. Die hier durchgeführten CGH-Analysen erfolgten an DNA aus Zellen von z. T. nur wenigen Millimeter großen Tumor- bzw. Vorläuferläsionen, welche durch Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebeverband isoliert wurden. Durch die Laser-Mikrodissektion wurde gewährleistet, dass nahezu originäre Tumor-DNA ohne Kontamination durch nicht neoplastische Zellen wie z. B. angrenzendes Stroma untersucht werden konnten. Die gewonnenen Gewebeareale waren durchschnittlich  $0,6 \text{ mm}^2$  ( $600.000 \text{ } \mu\text{m}^2$ ) groß und umfassten etwa 1.000 Zellen. Das entspricht einer Menge von etwa 6 ng DNA. Da für ein CGH-Experiment jedoch zirka  $2 \text{ } \mu\text{g}$  Ausgangs-DNA benötigt werden, war ein Amplifikationsschritt zur Vervielfältigung der gewonnenen genomischen DNA erforderlich. Dabei ist darauf zu achten, dass eine gleichmäßige Amplifikation für das gesamte Genom erfolgt, weil sonst das Hybridisierungsergebnis verfälscht (Bestimmung falsch positiver Zugewinne und Verluste im CGH-Profil) bzw. kein plausibles CGH-Profil erzeugt werden kann. Da es bisher keine standardisierte Vorgehensweise für CGH-Analysen mit fixierter DNA aus lasermikrodissezierten Zellen gibt, deren Genom zur Analyse vervielfältigt werden muss, werden im Folgenden die Ergebnisse verschiedener Methoden zur Amplifikation und Markierung genomischer DNA im Zusammenhang mit der konventionellen und der Array-CGH-Methode gegenübergestellt und bewertet.

### 4.1.1 DOP- und Ligations-PCR

Die verbreitetste Methode zur Amplifikation genomischer DNA ist die DOP-PCR. Deren spezielle Anwendung an Archivmaterial ist jedoch nicht unproblematisch. Bereits bei Testhybridisierungen auf Metaphasechromosomen wurden artifizielle Aberrationen detektiert. Insbesondere in Bereichen der Telomere, in denen sich spezifische repetitive DNA-Sequenzen einige tausendmal wiederholen können, scheinen die Zufallsprimer schlechter als im übrigen Genom zu binden.

Daher sind diese Bereiche nach der Amplifikation eher unterrepräsentiert. Als Folge werden im CGH-Profil falsch negative Hybridisierungsergebnisse abgelesen. Da die DNA aus Archivmaterial meist degradiert ist, ist davon auszugehen, dass die Primer nicht so optimal binden, wie dies bei genomischer DNA der Fall ist. Dies könnte eine wesentliche Ursache für die recht unregelmäßigen CGH-Profile sein. Laut Telenius *et al.* (1992) binden die Zufallsprimer zirka alle 4 kb im Genom.

Auch hatte die Art der DNA-Markierung einen Einfluss auf das Auftreten unspezifischer Aberrationen. So wurden von anderen Autoren nach DOP-PCR-Amplifikation und Markierung durch Nick Translation vermehrt Verluste auf den Chromosomenabschnitten 1p36 und 16p sowie auf den Chromosomen 19 und 22 gefunden (Kallioniemi *et al.*, 1994). Das bestätigte sich bei den hier durchgeführten Experimenten. Insgesamt waren die CGH-Profile von fixierter DNA eher ungleichmäßig, was zusätzlich auf ein ungünstiges Signal zu Hintergrundverhältnis hindeutete. Die DOP-PCR wurde auf eine mögliche Anwendung zur CGH-Analyse von Brustkrebsvorstufen getestet, konnte aber aus den oben genannten Gründen für die geplanten Analysen nicht eingesetzt werden.

Die Ligations-PCR eignete sich von allen getesteten Methoden am besten zur Amplifikation formalinfixierter DNA, ohne dass es zu artifiziellen Amplifikationsprodukten kam (siehe Kapitel 3.1.1 und Abbildung 3.1). Diese Methode wurde speziell zur Analyse von Einzelzellen entwickelt und schon wenig später auch für DNA-Analysen an Archivmaterial eingesetzt (Klein *et al.*, 1999; Stoecklein *et al.*, 2002). Ein Vorteil war, dass eine der Amplifikationsreaktion vorausgegangene DNA-Extraktion aus den wenigen laser-mikrodissezierten Tumorzellen nach Standardmethoden nicht notwendig war. Dies wurde hier unter Verwendung verschiedener Protokolle mehrfach versucht, führte aber zu keinem Ergebnis. Für die Ligations-PCR konnte die aufgeschlossene DNA aus nur wenigen Zellen direkt nach dem Proteinase K-Verdau den Teilschritten der Amplifikationsreaktion zugeführt werden.

Ein Vorteil gegenüber der DOP-PCR ist, dass diese Methode nicht auf der Bindung von Zufallsprimern basiert. Die fixierte DNA wird alle 200 bis 300 bp enzymatisch fragmentiert, bevor die Adapter ligiert und die DNA-Fragmente amplifiziert werden. Experimente von Stoecklein *et al.* (2002) haben gezeigt, dass Fragmente nach *Mse I*-Verdau, die > 400 bp sind, zur Verschlechterung des Gesamtergebnisses führen. Die Qualität der Hybridisierungen und der CGH-Profile war nach Ligations-PCR sehr gleichmäßig und sogar deutlich besser als nach DNA-Extraktion aus kompletten Gewebeschnitten, ohne Amplifikationsschritt und Markierung durch Nick Translation. Allerdings muss bei nicht mikrodisseziertem Gewebe der Verdünnungseffekt durch normale Zellen berücksichtigt werden. Die PCR-Produkte wurden vor der Hybridisierung auf Metaphasen in einer Markierungs-PCR indirekt mit Biotin- bzw. mit Digoxigenin-dUTP optimal markiert. Auch eine direkte Markierung mit Spectrum Green bzw. Spectrum Orange in der Markierungs-PCR resultierte in gleichwertigen Hybridisierungsergebnissen.

#### **4.1.2 „Multiple Strand Displacement Amplification“**

In den durchgeführten Testexperimenten lieferte die Amplifikation von nicht fixierter genomischer DNA aus Zelllinien oder Lymphozyten mittels MDA und deren Markierung durch Nick Translation optimale Hybridisierungsergebnisse ohne falsche Zugewinne und Verluste im CGH-Profil (siehe Abbildung 3.2). Auf eine simultane DNA-Markierung

während der Amplifikationsreaktion sollte allerdings eher verzichtet werden. Die Genomamplifikation durch MDA unter Nutzung der Enzyms *Phi29* DNA-Polymerase wurde im Rahmen von CGH- und Array-CGH-Analysen mehrfach angewandt, allerdings meist an unbehandelter DNA aus Zelllinien oder an DNA aus kryokonserviertem Gewebe (Cardoso *et al.*, 2004). Eine Anwendung der Methode an DNA aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Gewebe führte in den hier durchgeführten CGH-Experimenten bereits auf Metaphasepräparaten zu sehr unbefriedigenden Ergebnissen (siehe Kapitel 3.1.2). Da im gleichen Hybridisierungsexperiment die weibliche Referenz-DNA aus Lymphozyten sehr homogen durch MDA amplifiziert wurde, aber die Tumor DNA aus Paraffinmaterial nur sehr ungleichmäßig auf den Metaphasechromosomen hybridisierte, können technische Probleme bei der Durchführung ausgeschlossen werden. Die gleiche fixierte Tumor-DNA wurde durch Ligations-PCR optimal amplifiziert und auf Metaphasechromosomen hybridisiert (vergleiche Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2). Demnach sollte die Qualität der Tumor-DNA für eine Amplifikation generell ausreichend sein. Nach Anwendungsbeispielen des Kit-Herstellers wird die MDA-Amplifikation auch speziell für DNA aus Paraffinmaterial empfohlen, unter anderem zum Einsatz für die Array-CGH-Technik. Interessanterweise testeten auch andere Autoren die MDA-Methode an formalinfixierter DNA und berichteten von nicht auswertbaren Ergebnissen auf BAC-Arrays (Little *et al.*, 2005).

Als Hauptursache für eine nicht in üblicher Weise stattgefundenen Amplifikationsreaktion kommen die DNA-Degradierung und die durch das Formalin verursachten DNA-Doppelstrangbrüche und Protein-Querverbindungen (*crosslinks*) in Betracht. Bedingt durch die Reaktionskinetik der MDA-Methode ist eine Amplifikation nur mit intakter linearer DNA möglich. Während der exponentiell verlaufenden Amplifikation unter isothermen Bedingungen wird der komplementäre Strang jeweils ersetzt und dient als Vorlage zur Synthese eines neuen Stranges, der seinerseits wiederum als Matrize fungiert. Die Replikate werden im Verlauf der Reaktion immer kleiner. Ist die Ausgangs-DNA z. B. durch Formalinfixierung schon verhältnismäßig kurz, führt dies zu einer unspezifischen Reaktion, in der die Hexamerprimer selbst als Substrate dienen können. Solche unspezifischen Primerprodukte entstanden vermutlich auch in der Leerkontrolle (ohne DNA), da im Agarosegel eine typische Größenverteilung der Amplifikate zu sehen war. Geringe Mengen an Ausgangs-DNA kleiner 1 bis 5 ng oder Verunreinigungen führen ebenfalls zu einer unspezifischen und nicht gleichmäßigen Repräsentation des Genoms. Um die Probleme mit der degradierten DNA zu umgehen, haben Wang *et al.* (2004) eine modifizierte Methode, genannt RCA-RCA (Restriction and Circularization-Aided Rolling Circle Amplification), entwickelt. Mit geeigneten Restriktionsenzymen wird das Genom zunächst zwischen den durch Formalinfixierung hervorgerufenen DNA-Bruchstellen fragmentiert und die somit entstandenen intakten DNA-Fragmente durch Selbstligation zu einem Ring zusammengeführt. Gleichzeitig wird die verbleibende lineare, degradierte DNA durch eine Exonuklease entfernt und somit von der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen. Die DNA-Ringe werden dann durch „*Rolling Circle Amplification*“ (RCA) nach

Dean *et al.* (2001), basierend auf dem gleichen Prinzip wie die MDA-Methode mit der *Phi29* DNA-Polymerase, amplifiziert. Durch Anwendung dieser Methode konnte die Arbeitsgruppe von Wang *et al.* (2004) die oben genannten Probleme umgehen und vergleichbar gute Array-CGH-Profile wie ohne Genomamplifikation erzielen. Ob sich diese Technik für routinemäßige Untersuchungen an DNA aus formalinfixiertem Gewebe durchsetzen wird, ist noch nicht geklärt.

#### 4.1.3 Weitere Methoden zur Genomamplifikation

Die Random Priming-Methode, die meist zur direkten Fluoreszenzmarkierung von DNA für Array-CGH-Experimente verwendet wird, lässt sich interessanterweise nach einem modifizierten Protokoll von Devries *et al.* (2005) auch zur Amplifikation genomischer DNA (*Random Prime Amplification*, RPA) einsetzen. Dazu werden die üblichen Komponenten des „BioPrime Labeling Kits“ (Invitrogen) verwendet, aber im Unterschied zur DNA-Markierung werden bei der Amplifikation alle Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP und dGTP) in gleicher Konzentration benötigt und die Konzentrationen der Zufallsprimer und des Enzyms etwas modifiziert. Die Autoren fanden heraus, dass die Genomamplifikation von formalinfixierter DNA mittels Random Priming gegenüber der DOP-PCR von deutlichem Vorteil ist, obwohl bei der DOP-PCR die zwei bis fünffache Menge DNA entsteht. Allerdings waren nach der DOP-PCR die DNA-Fragmente deutlich kürzer und die Array-CGH-Profile streuten stärker. Unter Verwendung von isolierter DNA aus unfixiertem Gewebe, z. B. nach Kryokonservierung war die Amplifikation durch Random Priming und DOP-PCR gleichwertig gut. Die RPA-Amplifikationsreaktion erforderte mindestens 5 ng Ausgangs-DNA und verlief bei Einsatz von 50 ng DNA unter optimalen und reproduzierbaren Bedingungen. Den Autoren gelang es mit Hilfe der RPA-Methode und anschließender DNA-Markierung durch Random Priming fixierte Tumor-DNA erfolgreich auf Arrays (Chip mit 2.464 BACs) zu hybridisieren. Ihnen stand für die DNA-Extraktion nach Standardmethoden mit Phenol-Chloroform allerdings genügend laser-mikrodisseziertes Gewebe invasiver Brusttumore zur Verfügung, was bei den hier durchgeführten Experimenten an Vorläuferläsionen nicht der Fall war.

Ein weiterer interessanter Ansatz zur Amplifikation formalinfixierter DNA bietet die GenomePlex-Methode. Sie basiert auf der zufälligen Fragmentierung des Genoms und deren Umwandlung zu amplifizierbaren Einheiten, die mit universellen Primern amplifiziert werden können. Little *et al.* (2005) testeten verschiedene Protokolle zur DNA-Isolation und Genomamplifikation an Paraffinmaterial von Wilms Tumoren auf Ihre Anwendung für die Array-CGH-Technik. Durch die Isolation fixierter DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen) und der Amplifikation durch GenomePlex (Fa. Sigma-Aldrich) ließen sich optimale und reproduzierbare Array-CGH-Profile mit 5 ng Ausgangs-DNA im Vergleich zur nichtamplifizierten Kontrolle erzeugen, und die wie nach DOP-PCR häufig beobachteten artifiziellen Aberrationen traten nicht auf. Ähnlich wie bei der oben beschriebenen Random-Priming-Amplifikation resultierte die DOP-PCR gegenüber der GenomePlex-Amplifikation in einer höheren DNA-Ausbeute

(1.342 ng versus 631 ng bei jeweils 5 ng Ausgangs-DNA) und größeren DNA-Fragmenten (bis 1 kb versus < 800 bp). Allerdings war die Qualität der Array-CGH-Profile herabgesetzt. Bei der Verwendung von kryokonserviertem Gewebe gab es keine Unterschiede.

Für den routinemäßigen Einsatz werden sich in Zukunft leicht handhabbare Amplifikationstechniken (z. B. kommerziell verfügbare Kits) durchsetzen, die nur geringe Mengen Ausgangs-DNA erfordern. Nach den gegenwärtigen Erfahrungen mit fixierter DNA für konventionelle und Array-CGH-Analysen sind die Ligations-PCR, die GenomePlex-Amplifikation und die Amplifikation durch Random Priming sehr vielversprechende Methoden.

## **4.2 Methoden zur direkten DNA-Markierung und wichtige Voraussetzungen für die Array-CGH-Analyse**

### **4.2.1 Direkte DNA-Markierungsmethoden für die Array-CGH-Analyse**

Die Markierungs-PCR mit dem Enzym Thermo Sequenase war für die durch Ligations-PCR optimal präamplifizierte fixierte DNA von allen hier getesteten Markierungsmethoden zum Einbau der mit Cy3- und Cy5-Fluoreszenzfarbstoffen markierten Nukleotide für Array-CGH-Analysen am besten geeignet (Klein *et al.*, 1999; Fuhrmann *et al.* 2008). Dieses Enzym ist eine in seiner Sequenz modifizierte *Taq*-Polymerase und besonders dafür geeignet, die Nukleotide mit gebundenen Fluoreszenzmolekülen in die DNA einzubauen. Auch scheint es von Vorteil zu sein, an dCTP und an dUTP gekoppelte Cy3- bzw. Cy5-Farbstoffe zu kombinieren, um eine effiziente Markierung zu erreichen. Das heißt, dass die Tumor-DNA gleichzeitig mit Cy3-dCTP und Cy3-dUTP und die Kontroll-DNA entsprechend mit Cy5-dCTP und Cy5-dUTP markiert wurde. Andere Autoren wie z. B. Devries *et al.* (2005) verwendeten für ihre Array-CGH-Experimente ausschließlich an dUTPs gekoppelte Cy-Farbstoffe und Snijders *et al.* (2001) wiederum an dCTP gebundene Cy-Moleküle. Nach eigenen konventionellen CGH-Ergebnissen zeigten sich keine Unterschiede bei Einsatz von an dCTP's oder an dUTP's gebundene Cy3- bzw. Cy5-Moleküle. Möglicherweise ist das aber für die sensitiveren Array-CGH-Analysen von größerer Bedeutung.

Auch die Konzentration der eingesetzten Nukleotide entscheidet darüber, ob sie optimal eingebaut werden können. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, waren die durch PCR markierten DNA-Fragmente insgesamt länger als nach Markierung durch Random Priming, was die Hybridisierung begünstigte.

Das auf den Metaphasechromosomen sichtbare Bandenmuster nach Markierung durch Random Priming mit Cy3 und Cy5 (siehe Abbildung 3.4) kann ein Hinweis darauf sein, dass die Oktamere nach dem Denaturieren der Sonde nicht zufällig verteilt, sondern selektiv in Regionen bestimmter Basenzusammensetzung gebunden haben.

Außerdem ist die Basenpaarung über drei Wasserstoffbrücken zwischen G und C thermodynamisch stabiler gegenüber A und T. Ausgehend von den Bindungsstellen der Primer verlängert die „*Exo-Kleenow*“ Polymerase von deren 3'-Ende den DNA-Strang unter Inkorporation der Fluoreszenzmoleküle. Da das Bandenmuster bei der markierten Test- und Referenz-DNA in den gleichen Regionen auftrat, glichen sich die Unterschiede aus, so dass das Gesamtprofil nicht beeinträchtigt wurde. Das Random Priming ist die übliche DNA-Markierungsmethode für Array-CGH-Analysen, die auch für fixierte DNA verwendet wird. Die Arbeitsgruppe von Tsubosa und Kollegen hatte 2005 herausgefunden, dass diese Methode deutlich effizienter ist als die Nick Translation.

#### 4.2.2 Qualität der Test-DNA

Routinemäßig wird das Tumorgewebe in der Pathologie in Formalin fixiert und in Paraffin aufbewahrt. Die Qualität von isolierter DNA aus Gewebeproben verschiedener Archive kann variieren, z. B. bedingt durch die Art der Fixierung und Dauer der Lagerung. Daher wurden Versuche zur Verwendbarkeit gelagerter DNA durchgeführt. Übereinstimmend haben Legrand *et al.* (2002) und van Beers & Nederlof (2006) beobachtet, dass sich eine Verkürzung der Fixierdauer auf 24 bis 48 Stunden und die Verwendung von gepuffertem Formalin zur Verbesserung der DNA-Qualität aus formalinfixiertem Gewebe als günstig erweisen. Selbst eine Fixierdauer von unter 20 Stunden oder von bis zu 96 Stunden hatte im Zusammenhang mit Array-CGH-Analysen keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Qualität (Ghazani *et al.*, 2006). Gewebeblöcke, die länger als 25 Jahre aufbewahrt wurden, erwiesen sich für Array-CGH-Analysen als problematisch, aber mit 15 Jahre alten Proben wurden noch gute CGH-Ergebnisse gewonnen (van Beers & Nederlof, 2006). Für diese Arbeit wurden nur wenige Jahre alte Paraffinblöcke verwendet, deren isolierte DNA sich für den Einsatz der konventionellen CGH-Technik sehr gut eignete, aber für die Array-CGH-Technik sehr variabel war.

Die Erfahrungen haben gezeigt, dass eine PCR-basierte Qualitätskontrolle der Test-DNA vor einer Hybridisierung von Vorteil sein kann, um ungeeignete Proben von vornherein von der weiteren Bearbeitung auszuschließen. Auffällig bei den hier durchgeführten Kontroll-PCRs vor der Hybridisierung auf Arrays war, dass 93 % der Tumor-DNAs eine positive Bande bei 134 bp für das Gen  *$\alpha$ -Catenin* (D5S500) im Agarosegel zeigten, während mit dem zweiten Primerpaar für *TP53* (Exon 6) nur 33 % der Tumor-DNAs das zirka 250 bp große Fragment im Gel aufwiesen. Zur Hybridisierung auf Arrays wurden präferenziell Proben gewählt, die mit beiden Primerpaaren ein spezifisches PCR-Produkt im Gel zeigten (siehe Kapitel 3.7.1 und Tabelle 3.12). Ein zusätzliches Qualitätskriterium war ein optimales Hybridisierungsergebnis auf einem Test-Objektträger mit Metaphasechromosomen. Trotz dieser Auswahlkriterien konnten nicht alle ausgewählten Proben mit Erfolg auf Array-CGH-Chips hybridisiert werden. Offensichtlich stellt die hochauflösende Array-CGH besonders hohe Ansprüche an die DNA-Qualität. Auch fanden van Beers

& Nederlof (2006) heraus, dass eine einfache Bestimmung der DNA-Konzentration und die Bestimmung der Fragmentlänge auf einem Agarosegel als Qualitätskontrolle vor einer Hybridisierung nicht ausreicht. Sie empfehlen daher eine auf einer Multiplex-PCR basierende Qualitätskontrolle der zu hybridisierenden DNA. Solch ein Multiplex-PCR-Ansatz beinhaltet 4 Primersets, die 100, 200, 300 und 400 bp große Fragmente mit 100 ng Ausgangs-DNA generieren. Nur Fragmente von 200 bp und größer waren für die Array-CGH geeignet, während PCR-Produkte, die nur eine 100 bp-Bande im Agarosegel zeigten, nicht hybridisierten. Zu berücksichtigen ist, dass dieser Assay an extrahierter, noch nicht amplifizierter DNA etabliert wurde. Da bei der Genomamplifikation durch Ligations-PCR die Tumor- und Referenz-DNA durch den der Amplifikationsreaktion vorangegangenen *Mse I*-Verdau schon auf eine Länge von zirka 256 bp Länge gebracht worden ist, wäre der Assay für präamplifizierte DNA nur bedingt anwendbar.

Durch die Laser-Mikrodissektion wurde gewährleistet, dass nur Zellareale des Tumors ohne Beimengungen normaler Epithelzellen oder nekrotischer Anteile isoliert wurden. Daher sollte der Anteil der Tumor-DNA nahezu 100 % betragen. In Experimenten, in denen die Tumor-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen mit normaler DNA verdünnt wurde, fanden Johnson und Kollegen 2006 heraus, dass der Anteil von Tumor-DNA mehr als 70 % betragen muss, um verlässliche Array-CGH-Ergebnisse zu erhalten. Bei einem Verhältnis von < 50 % Tumor-DNA zu normaler DNA wurden Gewinne und Verluste größerer chromosomaler Regionen schwer wiedererkannt.

### 4.2.3 Qualität des Hybridisierungstargets

Für ein optimales Hybridisierungsergebnis ist neben der Qualität der Proben-DNA auch die Qualität des Hybridisierungsziels entscheidend. Bei der konventionellen CGH ist z. B. eine gute Spreitung der Metaphasen mit wenigen Zytoplasmaresten auf dem Präparat essentiell.

Ausschlaggebend für auswertbare CGH-Daten ist die Qualität der Arrays. Diese kann innerhalb einer Charge (Objektträger, die in einem Durchlauf hergestellt wurden) variieren, z. B. bedingt durch das Spotten der BAC-DNA auf die Matrix. Meist nimmt die Menge der aufgebrachten DNA mit aufsteigender Nummer zum Ende der Charge hin ab. Die Spots sind auf den ersten Objektträgern häufig recht groß und dicht. Mitunter können benachbarte Spots vor ihrem Eintrocknen miteinander verlaufen, so dass diese später nicht ausgewertet werden können. Mit aufsteigender Nummer zum Ende einer Charge hin ist die aufgebrachte DNA-Menge häufig reduziert, d. h. die Spotdurchmesser werden mitunter kleiner und häufig entstehen so genannte „Donuts“, Spots bei denen sich nur am äußeren Rand DNA befindet, jedoch nicht in der Mitte. Diese Spots werden ebenfalls im Verlaufe der weiteren Analyse von der Berechnung ausgeschlossen. Dadurch kann die gesamte Auflösung eines Chips stark reduziert sein. Werden beispielsweise von einem 6.000 BACs umfassenden Chip 1.000 Spots von der Analyse ausgeschlossen, beträgt die Ausfallrate zirka 17 %. Das bedeutet,

dass bestimmte genomische Regionen wie z. B. ein einzelnes Chromosom unterrepräsentiert sind. Unter der Voraussetzung gleichmäßig verteilter Ausfälle im Genom wäre die Auflösung statistisch gesehen von 0,5 Mb auf 0,6 Mb herabgesetzt. Auch die Streuung der Fluoreszenzintensitäten über das Genom steigt durch den Ausschluss einzelner Spots an, was zu einer erhöhten Standardabweichung führt und die Bestimmung der Aberrationen erschwert.

Bedingt durch das Waschen der Objektträger nach einer Hybridisierung können verbleibende Sondenreste und auch Reste von Salzen zu großflächigen Überlagerungen der eigentlichen Fluoreszenzsignale führen, die erst beim Scannen der Arrays sichtbar werden. Ein erneutes Waschen solcher Objektträger konnte die Waschartefakte meist etwas, aber nicht vollständig entfernen. Gleichzeitig wurden die Fluoreszenzintensitäten der Spots vermindert. Meist traten großflächigere Hybridisierungsartefakte im Cy3-Kanal auf, verursacht durch Salze, die bei der gleichen Wellenlänge mit angeregt wurden. Zur Auswertung und Berechnung der Daten stehen eine Vielzahl von Analyseprogrammen zur Verfügung. Diese sind zwar in der Lage, einen Teil des Hintergrundes herauszurechnen, können aber eine schlechte Hybridisierung oder einen Array mit verminderter Qualität nicht kompensieren.

### **4.3 CGH- und Clusteranalyse von normalem Epithel, Vorläuferläsionen, *in situ*- und invasiven Karzinomen**

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion konnten Zellen definierter Morphologie zielgerichtet ohne Kontamination durch anderes Gewebe aus formalinfixiertem Gewebe isoliert und nach Amplifikation der gewonnenen genomischen DNA mittels Ligations-PCR diese der CGH-Analyse zugeführt werden. Derzeit gibt es noch keine einheitlich standardisierte Vorgehensweise zur Probenaufbereitung und CGH-Analyse. Es bestehen methodische Unterschiede, z. B. in der Art der Probengewinnung (lasergestützte oder mechanische Mikrodissektion bzw. die Verwendung ganzer Gewebeschnitte ohne Mikrodissektion), des DNA-Extraktionsprotokolls und der Methode der Amplifikation sowie der Art der Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aberrationen von Gewebeproben unterschiedlicher Vorläufer- und Tumorstadien mittels CGH-Analyse bestimmt. Es wurden zehn Patientinnen mit einer ADH, 23 Patientinnen mit einem DCIS (vier Patientinnen mit DCIS Grad 1, neun Patientinnen mit Grad 2 und zehn mit Grad 3), 15 Patientinnen mit einem LCIS, sieben Patientinnen mit einem IDC und sechs Patientinnen mit einem ILC untersucht. Zusätzlich wurde histologisch als unauffällig klassifiziertes Epithelgewebe, das sich angrenzend zum Tumor befand, von 12 Patientinnen analysiert. Die Ähnlichkeit der Aberrationen zwischen den Patientengruppen wurde mit Hilfe der Clusteranalyse überprüft. Parallel zur konventionellen CGH-Methode wurde die Array-CGH-Technik an DNA-Proben von

sechs Patientinnen mit DCIS angewandt. Die eigenen CGH-Daten und die aus der Literatur bekannten Daten wurden genutzt, um ein Sondenset aus spezifischen FISH-Sonden für die Brustkrebsdiagnostik zu generieren.

#### 4.3.1 CGH-Ergebnisse von normalem Epithel angrenzend zum Tumor

Interessant ist, dass bei zwei von 12 Patientinnen die als normal klassifizierten Gewebeproben (Probe 58-2-N und Probe 90-N) Aberrationen aufwiesen (siehe Abbildung 3.14 und Tabelle 3.6). Dies wurde durch eine komplette Wiederholung der Analyse, einschließlich der Laser-Mikrodissektion, bestätigt. Auffällig war, dass sich die als normal eingestufteten Zellen in beiden Fällen in der Umgebung eines DCIS mit Kerngrad 3 befanden. Bei den Aberrationen handelte es sich um Zugewinne, Verluste und auch um Amplifikationen unter Einbeziehung von z. T. größeren Regionen, wie eines ganzen Chromosomenarms oder Chromosoms. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Zellen mit normaler Morphologie schon genetisch verändert sein können. Denkbar wäre auch, dass sich zwischen den normalen Zellen eine oder wenige Tumorzellen befanden, die morphologisch nicht von den normalen Zellen zu unterscheiden waren. Da die CGH-Methode hoch sensitiv ist, könnten trotz Verdünnungseffekt einzelne Tumorzellen ausgereicht haben, um Aberrationen zu detektieren.

Bei der Tumor- und autologen Kontrollprobe 90-DCIS und 90-N ist davon auszugehen, dass die untersuchten Zellen gleichen klonalen Ursprungs sind. Zum einen stimmten die Aberrationen zu zirka 60 % miteinander überein und zum anderen zeigten beide Proben einen Zugewinn in der Region 3p14-p21, was bei DCIS sonst eher ein seltenes Ereignis ist (Frequenz < 10 % in dieser Studie). Trotzdem kamen im DCIS auch Veränderungen vor, die in den normalen Zellen nicht gefunden wurden (z. B. Zugewinn von Chromosom 2, 11p und X) und auch bei der Kontrollprobe traten z. B. Zugewinne auf den Chromosomenarmen 14q und 15q auf, die bei der Tumorprobe nicht detektiert wurden.

Bei der zweiten aberranten Kontrollprobe (58-2-N) wurden insgesamt drei veränderte Regionen gefunden (+6p, +20q und -X). Die einzige gemeinsame Aberration, die in der ADH-Komponente des gleichen Schnittpräparates mit den normalen Zellen gefunden wurde, war ein Verlust des langen Arms von Chromosom X. Diese Veränderung trat auch im autologen DCIS auf, das in einem gesonderten Paraffinblock eingebettet war und erste Hinweise auf ein mikroinvasives Wachstum zeigte. Es ist bekannt, dass es bei Chromosom X durch den natürlichen Alterungsprozess ab einem Alter von 55 Jahren häufig zu Segregationsfehlern bei der Zellteilung zu einem Verlust genetischen Materials kommen kann (Orstavic, 2006; Pageau *et al.*, 2007). Die Patientin, deren Gewebe untersucht wurde, war 63 Jahre alt. Die Aberrationen zwischen dem als normal eingestufteten Epithelgewebe und dem DCIS, das sich in einem separat eingebetteten Paraffinblock befand, zeigten eine höhere Übereinstimmung als die zum Normalgewebe angrenzenden Zellen der ADH des

gleichen Schnittpräparates. Insgesamt scheint es sich bei dieser Patientin um ein heterogenes Tumorwachstum oder eine multifokale Tumorentwicklung zu handeln, da benachbart morphologisch unterschiedliche Tumorstadien vorliegen. Bei dem DCIS und dem als normal diagnostizierten Gewebe sind die Zellen vermutlich gleichen klonalen Ursprungs, während die Zellen der ADH sich aus einer anderen Subpopulation von Zellen entwickelt haben könnten. Da bei dem DCIS erste Hinweise auf ein mikroinvasives Wachstum beobachtet wurden, ist es möglich, dass vereinzelte Tumorzellen in das umliegende Gewebe ausgewandert sind, die dann bei der Mikrodissektion mit erfasst wurden.

In verschiedenen Studien wurde in normalen Epithelzellen, angrenzend zum Tumor „Loss of Heterozygosity“ (LOH) nachgewiesen, was ein Zeichen genomischer Instabilität ist und schon früh im Verlauf der Tumorgenese auftreten kann (Larson *et al.*, 2002). Dass die eigenen Ergebnisse kein Einzelfall sind, belegt die Array-CGH-Studie von Li *et al.* (2009). Hier wurden in mehreren Fällen in histologisch normal aussehendem Epithelgewebe in Nachbarschaft eines invasiven Brusttumors, das sich zirka 2 cm entfernt befand, Aberrationen detektiert, die denen des Primärtumors ähnelten. Einige vom Primärtumor entfernte aberrante Zellen könnten bereits Nährboden für einen sekundären Tumor mit zusätzlichen genetischen Aberrationen sein, wodurch das Tumorwachstum und seine metastatische Ausbreitung beschleunigt wird. Auch die eigenen Ergebnisse verdeutlichen, wie wichtig es ist, dass insbesondere bei der chirurgischen Entfernung eines DCIS mit Kerngrad 3 dieses ausreichend im gesunden Gewebereich entfernt wird. Leider liegen von den beiden beschriebenen Patientinnen keine Informationen vor, ob ein Rezidiv entstanden ist. Denkbar ist, dass auch bei den anderen elf Kontrollproben, deren CGH-Profile unauffällig waren, kleinere Veränderungen vorhanden sind, die durch die konventionelle CGH nicht detektiert werden konnten. Interessant wäre es, dies in einer zusätzlichen retrospektiven Studie mit der hochauflösenden Array-CGH-Methode zu überprüfen. Weiterhin wäre es denkbar, die Interphase-FISH-Technologie zur Überprüfung der Resektionsränder diagnostisch einzusetzen.

#### **4.3.2 CGH-Ergebnisse von ADH, *in situ*- und invasiven Karzinomen**

Die Art und Anzahl der genetischen Veränderungen beim Brustkrebs und deren Vorläuferstadien ist sehr heterogen und komplex. Bei den ADH, bei denen es sich formal noch nicht um ein Karzinom handelt, traten bei 5 Patientinnen Aberrationen auf (+4, -16q, -17p, +20q, +22 und -X), deren Häufigkeit nicht über 20 % (2 von 10 Patientinnen) lag. Die ADH unterscheiden sich somit hinsichtlich der Gesamtzahl an Aberrationen und auch bezüglich der Anzahl an Zugewinnen und Verlusten signifikant von anderen Patientengruppen wie den DCIS und IDC (siehe Abbildung 3.11). Auch Gong und Kollegen detektierten im Jahre 2001 Aberrationen bei fünf von neun ADH-Patientinnen. Am häufigsten zeigte sich in dieser Studie ein Verlust des langen Arms

von Chromosom 16 mit zirka 56 %. Ein Verlust von 17p wurde in zwei Fällen (22 %) gefunden. Beide Veränderungen wurden auch bei den hier durchgeführten Experimenten ermittelt. In der Studie von Aubele *et al.* (2000 b) wurde neben Verlusten genetischen Materials auf dem langen Arm von Chromosom 16 eine Amplifikation auf dem langen Arm von Chromosom 20 beschrieben. Bei den eigenen Untersuchungen trat bei einer Patientin ein Zugewinn von 20q auf. Amplifikationen genetischen Materials konnten jedoch in keinem Fall detektiert werden.

Bei *in situ*- und invasiven Karzinomen werden im Gegensatz zu den ADH häufig wiederkehrende genetische Veränderungen beobachtet. Die Aberrationen der DCIS beispielsweise ähneln stark denen der IDC, was dafür spricht, dass die DCIS direkte Vorstufen der IDC sind (Aubele *et al.*, 2002). Meist ist die Aberrationsfrequenz bei invasiven Karzinomen erhöht (Yao *et al.*, 2006). In Tabelle 4.1 sind von allen in dieser Studie untersuchten Patientengruppen die häufigsten Zugewinne und Verluste genetischen Materials auf den Chromosomenarmen zusammengefasst, die mit einer Frequenz > 35 % auftraten. Dabei wird deutlich, dass insbesondere Zugewinne auf 1q bei allen Patientengruppen (außer ADH) von Bedeutung sind und mit einer Häufigkeit von 50 bis zu 100 % detektiert wurden. Weiterhin sind sowohl bei DCIS, LCIS und IDC chromosomale Verluste von 16q und Zugewinne auf 17q sehr häufig. Wegen dieser Überlappungen gestaltet sich eine eindeutige tumorstadienspezifische Gruppeneinteilung anhand von chromosomalen Aberrationen schwierig. Dennoch sind genetische Marker aus hoch aberranten Regionen dieser drei Chromosomenarme besonders geeignet, um sowohl *in situ*- als auch invasive Karzinome zu diagnostizieren. Daher wurden die Regionen 1q32.1 (*GAC1*), 16q22.1 (*CDH1*) und 17q21 (*HER-2/neu*) und fünf weitere Genregionen in das generierte FISH-Sondenset zur Brustkrebsdiagnostik mit einbezogen. Die ausgewählten Regionen und deren Gene werden in Kapitel 4.7 diskutiert.

Mit zunehmendem Kerngrad wurde bei den DCIS eine Erhöhung chromosomaler Zugewinne und Verluste und auch eine vermehrte Anzahl an Amplifikationen beobachtet, die jedoch auf Grund geringer Fallzahlen einzelner Gruppen nicht signifikant war (siehe Abbildung 3.11). Insgesamt wiesen die DCIS durchschnittlich etwas weniger Aberrationen als die IDC auf (8 versus 12), jedoch die Anzahl an genetischen Veränderungen der DCIS Grad 3 war gegenüber den IDC (14 versus 12) leicht erhöht. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant. Die von DCIS Grad 1 zu DCIS Grad 3 abnehmende Frequenz chromosomaler Verluste auf dem Chromosomenarm 16q, die bereits in der Studie von Roylance *et al.* (1999) entdeckt wurde (Grad 1: 65 %, Grad 2: 50 %, Grad 3: 20 %), konnte bei den hier analysierten Tumorproben bestätigt werden (Grad 1: 50 %, Grad 2: 44 %, Grad 3: 30 %). Diese Ergebnisse führten bereits frühzeitig zu der Annahme, dass eine Tumorentwicklung vom *low-grade* zum *high-grade*-Karzinom eher unwahrscheinlich ist und verschiedene Progressionswege existieren müssen.

**Tabelle 4.1: Häufigste Zugewinne und Verluste genetischen Materials bei verschiedenen Tumorstadien**

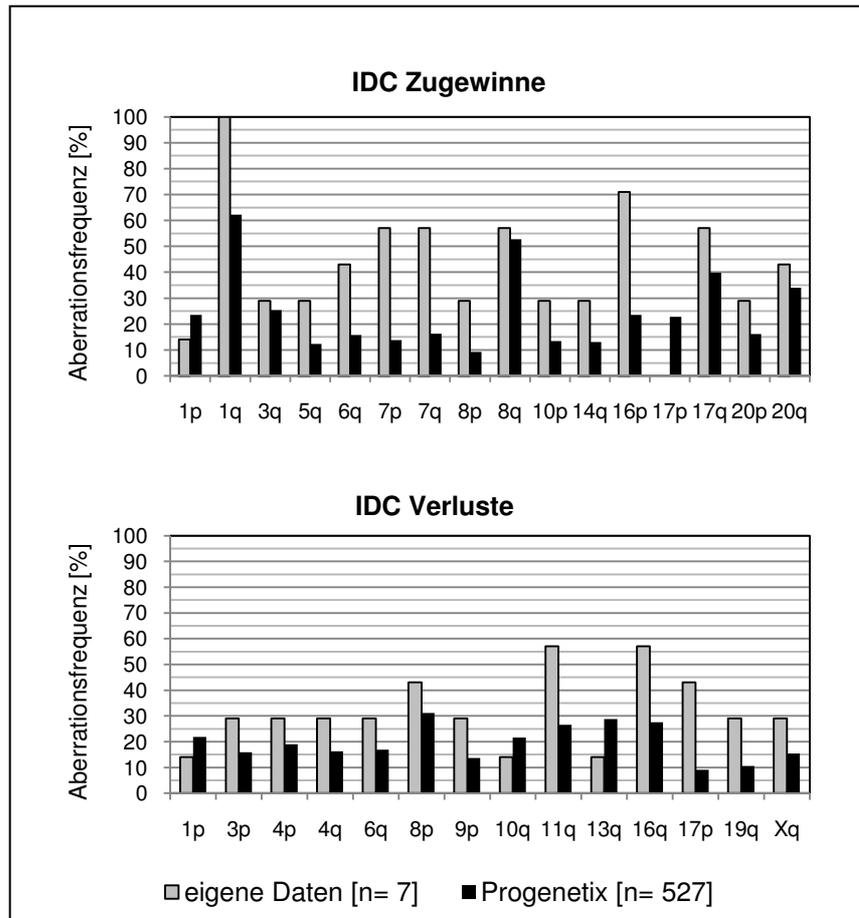
Es wurden die häufigsten Zugewinne (grün) und Verluste (rot) genetischen Materials aus den CGH-Daten dieser Studie zusammengefasst, die den gesamten Chromosomenarm oder einzelne chromosomale Regionen einschlossen. Die Frequenz der Zugewinne und Verluste ist für die einzelnen Tumorgruppen in Prozent angegeben, aufsteigend nach Chromosomen sortiert und bezieht sich auf die Anzahl der Patientinnen. Chromosomenarme, die pro Gruppe < 35 % Zugewinne oder Verluste zeigten, wurden nicht berücksichtigt.

Chr.	ADH [n= 10]	DCIS gesamt [n= 23]	LCIS [n= 15]	IDC [n= 7]	ILC [n= 6]
1q		61	87	100	50
6p		35	40		
7p				57	
7q				57	
8p		52		43	
8q		43		57	
11q				57	
16p				71	
16q		39	73	57	
17p		43		43	
17q		65	40	57	
20q		39		43	

Aus den CGH-Ergebnissen autologer Gewebeproben bei DCIS (siehe Kapitel 3.4) wurden meist gemeinsame Aberrationen festgestellt. Insbesondere in chromosomalen Regionen mit einer Amplifikation oder homozygoten Deletion betrug die Übereinstimmung durchschnittlich 88 %, was auf eine klonale Verwandtschaft der Zellen hinweist. Auch bei den autologen Gewebeproben einer ADH- und einer DCIS-Komponente (Probe 58-1 und 58-2) wurden gemeinsame Veränderungen gefunden, was für eine Entwicklung der ADH zu einem DCIS spricht. In der Clusteranalyse (siehe Abbildung 3.17) wurde deutlich, dass die Aberrationsmuster autologer Gewebeproben meist ähnlicher waren als Proben unterschiedlicher Patientinnen und diese dementsprechend im Dendrogramm meist näher zusammen liegen. CGH-Untersuchungen von Waldman *et al.* (2000), die bei 18 Patientinnen mit DCIS als Primärtumor auch Gewebe der aufgetretenen Rezidive analysierten, fanden bei gleicher Berechnung zirka 81 % gemeinsame Aberrationen, was auf eine klonale Verbindung von Rezidiv und Primärtumor hindeutet.

Beim Vergleich häufig wiederkehrender Aberrationen zwischen den eigenen CGH-Daten invasiver Karzinome mit bereits publizierten CGH-Daten, die in der Datenbank „Progenetix“ aufgenommen wurden (IDC: n= 527 und ILC: n= 64), fällt trotz der geringen Fallzahlen der eigenen Studie (IDC: n= 7 und ILC: n= 6) eine relativ gute

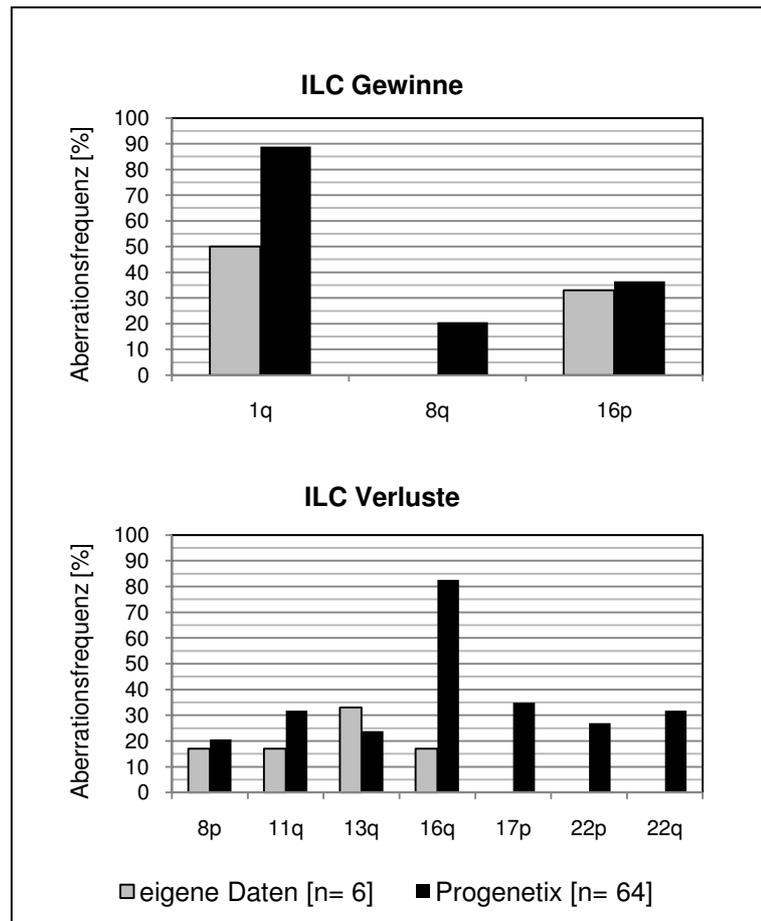
Übereinstimmung auf (siehe Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Die häufigsten Zugewinne genetischen Materials bei den IDC (Frequenz >20 %) sind auf den Chromosomenarmen 1q, 3q, 8q, 16p, 17p, 17q und 20q zu finden, wobei die in dieser Studie ermittelten Frequenzen für 6q, 7p, 7q und 16p eher überdurchschnittlich häufig waren. Amplifikationen wurden bei allen IDC auf dem Chromosomenarm 1q und vereinzelt auf den Chromosomenarmen 4q, 8q, 14q, 16p, 17q, 18q, 20q und Xq gefunden.



**Abbildung 4.1: Übersicht zu den häufigsten Zugewinnen und Verlusten bei IDC**

Die häufigsten Zugewinne und Verluste genetischen Materials aus den CGH-Daten dieser Studie (n= 7) wurden mit bekannten Daten aus der Datenbank „Progenetix“ (n= 527) zusammengefasst. Zur Darstellung wurden Veränderungen eines gesamten Chromosomenarms oder einzelner chromosomaler Regionen eingeschlossen. Die Frequenz der Zugewinne und Verluste ist in Prozent angegeben, aufsteigend nach Chromosomen sortiert und bezieht sich auf die jeweilige Anzahl der Patientinnen. Chromosomenarme, die pro Gruppe < 20 % Zugewinne oder Verluste in beiden Datenreihen zeigten, wurden nicht berücksichtigt.

Eine gleichzeitige Amplifikation von 8p12 und 11q13, die in der Literatur beim invasiven Mammakarzinom als recht häufig gilt und mit einer schlechten Prognose korreliert (Letessier *et al.*, 2006; Kwek *et al.*, 2009), wurde hier bei den invasiven Karzinomen und LCIS nicht gefunden und trat nur bei einem DCIS Grad 2 (Probe 97) auf. Amplifikationen in den Regionen 8p12 oder 11q13 hingegen wurden vereinzelt bei den *in situ*-Karzinomen beobachtet. Verluste genetischen Materials traten bei den IDC mit einer geringeren Frequenz als die Zugewinne auf. Am häufigsten waren die Chromosomenarme 1p, 8p, 10q, 11q, 13q, 16q betroffen.



**Abbildung 4.2: Übersicht zu den häufigsten Zugewinnen und Verlusten bei ILC**

Vergleich der häufigsten Zugewinne und Verluste genetischen Materials bei Patientinnen mit ILC aus den CGH-Daten dieser Studie (n= 6) mit bekannten Daten aus der Datenbank „Progenetix“ (n= 64) entsprechend der Abbildung 4.1.

Die ILC weisen eine signifikant niedrigere Aberrationsfrequenz als die IDC auf. Zugewinne genetischen Materials mit einer Häufigkeit von mehr als 20 % betreffen die Chromosomenarme 1q, 8q und 16p. Die häufigsten Verluste treten meist auf dem langen Arm von Chromosom 16 auf, was meist gleichzeitig mit Zugewinnen auf 1q einhergeht. Weitere für ILC wichtige chromosomale Regionen mit Verlusten befinden sich auf den Armen 8p, 11q, 13q, 16q, 17p, 22p und 22q. Zugewinne genetischen

Materials auf den Chromosomenarmen 8q und Verluste auf 17p, 22p und 22q wurden in dieser Studie auf Grund geringer Fallzahlen nicht gefunden.

#### 4.3.3 Clusteranalyse der CGH-Daten und Prognose

Mit Hilfe der Clusteranalyse wurden alle analysierten Gewebeproben (außer DCIS-Probe 86) anhand ähnlicher Aberrationsmuster zu fünf Gruppen zugeordnet (siehe Abbildung 3.18, A und B). Zwischen den DCIS Grad 1 und den ADH wurde ein unterschiedliches Muster deutlich. Die Proben der Low-Grade-DCIS gruppieren zu 33 % zum stark aberranten und die ADH-Proben mit 55 % mehr zum normalen Cluster. Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl von Tumorproben der DCIS Grad 1 ist die Beantwortung der Frage, ob es sich bei den ADH schon um „kleine DCIS“ handeln könnte, nicht möglich. Die Clusterzuordnung war einerseits sehr unterschiedlich, da die ADH entweder keine oder nur vereinzelt Aberrationen aufwies. Andererseits spricht für diese These, dass sie ähnliche genetische Veränderungen wie die DCIS Grad 1 aufzeigen (siehe Kapitel 3.3.1) und auch hinsichtlich der Morphologie wäre dies durchaus denkbar, denn Kerngrad, -form, -größe und Chromatinverteilung der Zellen sind sehr ähnlich. Der Unterschied zwischen einer ADH und einem DCIS besteht darin, dass bei einer ADH eine duktulo-lobuläre Einheit nur partiell betroffen ist, während sich beim DCIS die intraduktale Proliferation über die gesamte Einheit erstreckt. Daher ist die Abgrenzung zwischen einer ADH und einem Low-Grade-DCIS gerade bei kleineren Tumorherden für den Pathologen häufig schwierig. Auch wenn die morphologischen Eigenschaften der Tumorzellen auf eine enge Verwandtschaft zwischen ADH und DCIS Grad 1 hindeuten, ist das DCIS nicht nur morphologisch, sondern auch auf Grund der höheren Anzahl genetischer Aberrationen und deren Komplexität weiter entwickelt. Weiterführende Analysen mittels Interphase-FISH könnten die Diagnostik von ADH und DCIS Grad 1 unterstützen.

Rezidive wurden bei drei Patientinnen mit einem LCIS, einer Patientin mit einem IDC und einer Patientin mit einem ILC diagnostiziert. Die Gewebeproben der drei LCIS-Patientinnen wurden in Cluster 4 mit häufigen Veränderungen auf 1q und 16q eingruppiert. Bei einer LCIS-Patientin (autologe Proben 74-1 und 74-2) beschränkten sich die Aberrationen lediglich auf den Zugewinn von 1q und den Verlust von 16q. Bisher traten bei den DCIS-Patientinnen keine Rezidive auf, obwohl bekannt ist, dass zirka 25 % der DCIS-Patientinnen in Abhängigkeit vom Abstand des Resektionsrandes, der Tumorgröße, des Kerngrades und einer erfolgten Bestrahlungstherapie ein Rezidiv bilden können (Waldman *et al.*, 2000). Dies war überraschend, da die DCIS-Proben meist komplexere Aberrationen, einschließlich Amplifikationen, als die LCIS zeigten und hauptsächlich dem Cluster 3 „stark aberrant“, insbesondere die DCIS Grad 3, zugeordnet wurden. Daher könnte das vermehrte Auftreten von Rezidiven bei den LCIS theoretisch mit spezifischen genetischen Veränderungen, wie dem Zugewinn von 1q und dem Verlust von 16q assoziiert sein, der bei allen drei LCIS-Patientinnen gefunden wurde. Dem widerspricht allerdings, dass diese Veränderungen auch bei den gut differenzierten DCIS auftreten und z. B. ein Verlust von 16q statistisch gesehen mit

einer guten Prognose korreliert (Climent *et al.*, 2007). Eine andere Ursache für das vermehrte Auftreten von Rezidiven in der Gruppe der LCIS könnte im Wachstumsverhalten des Tumors oder in der unterschiedlichen Art der Therapie begründet sein. Einen Prognoseindex unter Einbeziehung von Tumorgröße, des Vorhandenseins von Komedonekrosen und des Resektionsrandes (< 1 cm verschlechterte Prognose) gibt es bei den LCIS nicht. Möglicherweise war bei der operativen Entfernung der Tumore der Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe nicht ausreichend genug, so dass einige Tumorzellen in der Brust verblieben sind, die sich weiter vermehrt haben und dann ein Rezidiv zur Folge hatten.

In der Studie von Li *et al.* (2006) wurden epidemiologische Daten von 37.629 Patientinnen mit einem DCIS und 4.490 Patientinnen mit einem LCIS der Jahre 1988 bis 2001 miteinander verglichen. Dabei fanden die Autoren heraus, dass LCIS-Patientinnen fünfmal so häufig ein ILC entwickelten wie Patientinnen mit einem DCIS. Aus den Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, dass das LCIS als Vorläuferläsion betrachtet werden muss statt nur als Läsion mit erhöhtem Brustkrebsrisiko. Deshalb sollte eine Behandlung schon frühzeitig und lokal erfolgen. Auch als Konsequenz der eigenen Daten wäre daher zu prüfen, ob ein größerer Resektionsrand beim LCIS und eine lokale Therapie sinnvoll sind. Für die eigene Studie sind nicht in allen Fällen Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf vorhanden und meist liegen die Operationen nur wenige Jahre zurück. Bei den DCIS wurden trotz z. T. komplexer Aberrationen bisher keine Rezidive gefunden. Dass allerdings auch gut differenzierte DCIS ein malignes Potential besitzen können, hat beispielsweise die Studie von Sanders *et al.* (2005) gezeigt. Innerhalb eines Zeitraumes von 29 Jahren nach der Biopsie hatte sich bei 11 von 28 Patientinnen im gleichen Quadranten der Brust ein invasives Karzinom entwickelt.

Der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark korreliert mit einer schlechten Prognose und steht in engem Zusammenhang mit der Ausbildung von Fernmetastasen. Aktuelle Arbeiten zur genomischen Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark der Arbeitsgruppe von Klein und Kollegen haben gezeigt, dass diese schon viel früher als bisher angenommen streuen können. Am Mausmodell mit *Her-2/neu*-transgenen Mäusen wurde beispielsweise gezeigt, dass so bald das *Her-2/neu*-Onkogen angeschaltet wird, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auftreten und dass dies auch schon bei Vorläuferläsionen wie ADH und im Stadium des *in situ*-Karzinoms erfolgen kann. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben das Durchbrechen einzelner Zellen durch die Basalmembran in frühen Stadien belegt (Schmidt-Kittler *et al.*, 2003; Klein, 2008; Husemann & Klein, 2009). Für den Menschen würde dies bedeuten, dass Patientinnen mit ADH, DCIS oder LCIS bereits Tumorzellen im Knochenmark aufweisen könnten, bei denen z. B. das Onkogen *Her-2/neu* aktiviert ist, was bisher jedoch nicht überprüft wurde. Daher müssen neue Therapieansätze gefunden werden, die es ermöglichen, die Dissemination bzw. deren Ansiedlung zu verhindern.

In Kapitel 4.3.2 wurde auf die Schwierigkeiten einer stadienspezifischen Gruppeneinteilung anhand von chromosomalen Aberrationen hingewiesen. Auch die Ergebnisse der ermittelten Expressionsdaten an Schnittpräparaten für HER-2, ER, PgR und dem Proliferationsmarker Ki-67 sind sehr komplex und lassen kein clusterspezifisches Muster erkennen. Bezüglich des ER-Status kam auch die Arbeitsgruppe von Yao und Kollegen zu dieser Feststellung, in deren Clusteranalyse Tumorproben von zehn DCIS und 18 IDC-Patientinnen mit eingeschlossen waren (Yao *et al.*, 2006).

Unter Berücksichtigung des Tumorprogressionsmodells von Simpson *et al.* (2005), vorgestellt in Kapitel 1.1.4 und Abbildung 1.3, das zwei verschiedene Progressionswege, den „*low-grade*“- und „*high-grade*“-Weg unter Einbeziehung histopathologischer Daten und Erkenntnissen aus Genexpressionsanalysen aufzeigt, wäre eine Zuordnung der Patientinnen mit Rezidiv zu einem dieser Wege zu erwarten gewesen. Es stellte sich jedoch heraus, dass dies nicht der Fall war. Denn alle diese Tumorproben waren hormonrezeptor-positiv, was prognostisch eher günstig ist und dem „*low-grade*“-Arm entspräche, aber bei drei der fünf Patientinnen (4-IDC, 9-ILC, 61-LCIS) war der HER-2-Status der Proben entsprechend dem „*high-grade*“-Arm positiv, bei den anderen beiden Patientenproben (71-LCIS, 74-LCIS) negativ. Unter den HER-2-positiven Proben befand sich auch ein LCIS (Probe 61) und ein ILC (Probe 9). Nach dem Modell entspricht das klassische LCIS und ILC dem „*low-grade*“-Weg. Da aber eine ganze Reihe der LCIS und ILC (in dieser Studie zirka 50 % bzw. 80 %) positiv für HER-2 sind, ist zu überlegen, auch das klassische LCIS und ILC in den prognostisch ungünstigeren „*high-grade*“-Weg zusätzlich mit aufzunehmen. Eine erhöhte Anzahl an Aberrationen wurde bei den Patientinnen mit Rezidiv, außer bei Probe 61-LCIS (11 Aberrationen) nicht beobachtet. Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass gute und schlechte prognostische Eigenschaften gleichzeitig auftreten können, was die Eingruppierung der Proben erschwert. Um exaktere Aussagen treffen zu können, wären Verlaufsdaten von einem größeren Patientenkollektiv notwendig. Weiterhin wären Methylierungs- und Transkriptomanalysen sehr hilfreich, um Biomarker für die Prognosestellung zu ermitteln.

#### 4.4 Array-CGH-Analyse

Bisherige CGH-Untersuchungen zu *in situ*-Karzinomen erfolgten meist mit der konventionellen Technik, der Hybridisierung auf Metaphasechromosomen. Wie in Tabelle 4.2 zu sehen ist, sind bisher erst wenige Array-CGH-Studien zu *in situ*-Karzinomen bekannt. Die DNA-Proben wurden entweder aus formalinfixiertem oder kryokonserviertem Gewebe gewonnen und diese mittels DOP-PCR oder Random Priming amplifiziert. Bei den aufgelisteten Publikationen zeigt sich ein breites Spektrum der verwendeten Microarrays mit unterschiedlichem Auflösungsvermögen, wie z. B. Arrays mit gespotteten BACs oder kommerziell erhältliche Oligonukleotid-Arrays.

**Tabelle 4.2: Array-CGH-Studien zu frühen Brustkrebsstadien**

In der Übersicht wurden ausschließlich Array-CGH-Studien zur Genomanalyse früher Brustkrebsstadien berücksichtigt. Publikationen zu Brustkrebszelllinien und invasiven Karzinomen sind nicht erfasst.

Tumortyp (n) <sup>a</sup>	Fixierung	MD	Genomamplifikation	Array-Plattform (Auflösung in Mb)	Bemerkung	Referenz
LCIS/ ILC (24)	FFPE	manuell	RPA	~2.400 BACs (1,5 Mb)	Tumore synchron	Shelley Hwang <i>et al.</i> (2004)
ILC/ DCIS/ LCIS (1)	FFPE	manuell	RPA	1.777 BACs (~1,5 Mb)	multiple Foci	(Nyante <i>et al.</i> , 2004)
DCIS (2)	Kryo	manuell	-	4.134 BACs (0,9 Mb)	außerdem: IDC (39), ILC (2), synchrones IDC/ ILC (4)	Naylor <i>et al.</i> (2005)
ILC Grad II/ LCIS (1)	FFPE	manuell	DOP-PCR	5.620 BACs (< 1 Mb)	Tumor pleomorph und synchron	Reis-Filho <i>et al.</i> (2005)
ALH (12), LCIS (13)	FFPE	LCM	DOP-PCR	~32.000 BACs (~0,1 Mb)	davon ALH/ LCIS synchron (4)	Mastracci <i>et al.</i> (2006)
LCIS/ ILC (8)	FFPE	LCM	RPA	Oligonukleotide (Agilent)	Tumore synchron	Morandi <i>et al.</i> (2006)
DCIS (10)	Kryo	-	-	14.160 cDNAs (100 kb, Agilent)	außerdem: IDC (18)	Yao <i>et al.</i> (2006)
DCIS (57)	Kryo	-	-	3.500 BACs (1 Mb)	außerdem Genexpression DCIS (26)	Vincent-Salomon <i>et al.</i> (2008)

<sup>a</sup>Anzahl der analysierten Patientinnen, MD = Mikrodissektion, FFPE = formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe, Kryo = Kryokonservierung von frischem Gewebe, LCM = Laser-Mikrodissektion, RPA = Genomamplifikation durch Random Priming

#### 4.4.1 Array-CGH-Analyse an ausgewählten DCIS

Nach der Untersuchung der Proben-DNA aus formalinfixierten Gewebeproben durch konventionelle CGH und Experimente zur Optimierung der Array-CGH-Technik (siehe Kapitel 3.2 und 3.3) wurden Array-CGH-Analysen exemplarisch an Proben von sechs Patientinnen mit DCIS durchgeführt (siehe Kapitel 3.7). Wichtige methodische Aspekte der Array-CGH-Technik wurden bereits in Kapitel 4.2 diskutiert.

Die höhere Anzahl gefundener Aberrationen mittels Array-CGH im Vergleich zur konventionellen CGH lässt sich teilweise durch die verbesserte Auflösung erklären (siehe Tabelle 3.13). Bei genauerer Betrachtung stellt sich heraus, dass trotzdem meist eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen beider Techniken erzielt wurde (siehe Abbildung 3.23). Das hängt damit zusammen, dass sich eine in der konventionellen CGH veränderte Region mit der Array-CGH in mehrere einzelne Veränderungen aufteilte. Die mit der Array-CGH zusätzlich gefundenen Aberrationen,

v. A. Verluste genetischen Materials z. B. auf den Chromosomenarmen 16q, 17p, 17q und 20q hätten vom Auflösungsvermögen her mit der konventionellen CGH detektiert werden können. Bei 16q handelt es sich um weiter zum Telomer gelegene Regionen, die möglicherweise bei der CGH problematisch waren. Für den Chromosomenarm 20q sind eher Zugewinne chromosomalen Materials als Verluste zu erwarten. Mit geeigneten FISH-Sonden könnten die abweichenden Ergebnisse exemplarisch an histologischen Präparaten validiert werden, um zu prüfen, ob es sich um tatsächliche Aberrationen oder Hybridisierungsartefakte handelt.

In Tabelle 3.14 wurden anhand der Array-CGH-Ergebnisse der sechs analysierten DCIS häufig wiederkehrende Aberrationen mit minimaler Überlappung für 16 Regionen, lokalisiert auf acht verschiedenen Chromosomen erfasst. Die Größe dieser minimal überlappenden Regionen variiert zwischen 0,3 und 11,5 Mb. Darunter sind einige kleinere amplifizierte Regionen, die nur wenige Gene enthalten und für weitere Studien von Interesse sein könnten. Unter den hier bei den sechs DCIS gefunden überlappten Regionen befindet sich unter anderem das für invasive duktales Karzinome häufig beobachtete Amplikon auf der Bande 20q13 (*ZNF217*, *BCAS1*, *BMP7*), auf das in Kapitel 1.2.2.2 eingegangen wurde. Neuere Array-CGH-Studien konnten auch die häufig wiederkehrende Amplifikation dieser Genregion für Patientinnen mit DCIS bestätigen (Yao *et al.*, 2006); Vincent-Salomon *et al.*, 2008).

Im nächsten Abschnitt wird näher auf die in Kapitel 3.7.4 beschriebene Amplifikation in der Region 14q12-q21 eingegangen, die mit der konventionellen CGH-Methode nachgewiesen wurde und deren genomische Position mittels Array-CGH-Technik noch exakter eingrenzt wurde. In diese Region kartieren 24 Gene (siehe Abbildung 3.24), deren Bedeutung zur Entstehung von Brustkrebs bisher noch unklar ist. Nach Literaturlage scheint dies von Interesse zu sein.

#### **4.4.2 Amplifikation der Region 14q12-q21**

Die in der Region 14q12-q21.1 gefundene Amplifikation trat insbesondere bei den DCIS (Frequenz 13 %) auf. Am Tumor 86 wurde durch Array-CGH ermittelt, dass die Größe des Amplikons etwa 3,2 Mb bis maximal 5,6 Mb umfasst und zirka 24 verschiedene Gene und Transkriptionseinheiten enthält.

Rekurrente Amplifikationen bei Brusttumoren wurden am häufigsten bei den Chromosomen 1, 8, 11, 12, 17, 18 und 20 gefunden (Fridlyand *et al.*, 2006). Zugewinne von genetischem Material auf Chromosom 14 wurden durch CGH-Analysen am Mammakarzinom zwar mehrfach belegt (Courjal & Theillet, 1997; Aubele *et al.*, 2000 a; Forozan *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002), allerdings gibt es bisher keine näheren Untersuchungen zu Amplikons in der Region 14q12-q21.1. Nach Angaben der CGH-Datenbank „Progenetix“ ([www.progenetix.net](http://www.progenetix.net)), die Daten von 780 Brustkrebspatientinnen enthält, werden Zugewinne, jedoch keine Amplifikationen, für die Banden 14q12 mit einer Frequenz von 6,7 % und für 14q21.1 mit 5 % angegeben.

Amplifikationen in der Region sind in der Literatur wegen der geringen Häufigkeit nicht näher beschrieben worden. Die konventionelle CGH-Studie von Forozan *et al.* (2000) an 38 Brustkrebszelllinien belegt beispielsweise, dass Amplifikationen (Ratio > 1,4), die die Bande 14q21 umspannen, bei drei der Zelllinien auftreten. Allerdings wird aus der Ergebnisdarstellung im Ideogramm nicht ersichtlich, um welche der Zelllinien es sich handelte. Der Fokus der genannten Studie war mehr auf die häufigsten rekurrenten Aberrationen gerichtet, so dass auf die Amplifikationen der Region 14q21 (Frequenz zirka 8 %) nicht eingegangen wurde.

Auch durch hochauflösende Array-CGH Untersuchungen an sieben bekannten Brustkrebszelllinien konnte mit einem 32.433 BACs umfassenden Chip bei der Zelllinie BT-474 eine Amplifikation in der Region 14q11.2-q21.1 detektiert werden, die jedoch nicht näher beschrieben wurde (Shadeo & Lam, 2006).

In größeren Array-CGH-Studien zum Brustkrebs wie z. B. in der von Nessling *et al.* (2005), die 31 fortgeschrittene Primärtumore mit einem 422 genomische Sequenzen umfassenden Chip, einschließlich der Sequenzen von 47 Protoonkogenen und 15 Tumorsuppressorgenen, untersuchten, fanden sich keine rekurrenten Amplifikationen auf 14q. Bei genauerer Betrachtung der ergänzenden Daten zur Publikation konnte festgestellt werden, dass bei einem Tumor die Banden 14q12-q13 und 14q21 und bei einem weiteren Tumor die Bande 14q21 in ein bis zwei Kopien vervielfältigt war. Allerdings ist zu bemerken, dass jede der Regionen nur durch einen einzigen BAC auf dem Chip repräsentiert war und Chromosom 14 durch insgesamt 8 BACs abgedeckt wurde. Der für diese Studie verwendete Chip umfasste in Abhängigkeit von der Charge etwa 110 BACs für Chromosom 14, was einer Auflösung von zirka 0,8 Mb für dieses Chromosom entspricht.

In einer umfangreichen Studie von Naylor *et al.* (2005) wurde DNA von 47 primären Brusttumoren und 18 Zelllinien auf einen 4.134 BACs umfassenden Array hybridisiert. Für die Datenauswertung wurden Aberrationsfrequenzen  $\geq 30\%$  berücksichtigt, so dass nicht zu ersehen ist, ob vereinzelt auch Amplifikationen auf 14q auftraten.

Von Reichenberger *et al.* (2005) wurde ein weiter telomerisch auf der Bande 14q23 gelegenes und mit BACs kartiertes etwa 5 Mb großes Amplikon beschrieben. Die Autoren haben bei 4,7 % von 214 untersuchten invasiven duktalem Mammakarzinomen eine Amplifikation und gleichzeitige Überexpression des Gens *SIX1* dieser Region gefunden, welches bei der Stimulation von Zellproliferation und Hemmung der Apoptose involviert ist. Interessant war, dass bei den in dieser Arbeit untersuchten DCIS und LCIS die Bande 14q23 nur bei einem LCIS amplifiziert war und bei drei weiteren LCIS ein Zugewinn beobachtet wurde (siehe Abbildung 3.13). Auffällig war, dass bei den DCIS ab Bande 14q22, einschließlich 14q23, eher weite Teile von Chromosom 14 deletiert, statt amplifiziert waren (Frequenz 26 %), was durch weitere CGH-Studien belegt wurde (Tanner *et al.*, 1998; Burki *et al.*, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass bestimmte Kandidatengene in der Region 14q23 als potentielle Tumorsuppressorgene von Bedeutung sein könnten.

Obwohl Amplifikationen der Region 14q12-q21.1 beim Brustkrebs mit einer Frequenz von wahrscheinlich weniger als 10 % auftreten und bisher nicht näher beschrieben wurden, ist in Betracht zu ziehen, dass durch den Prozess der Amplifikation Gene (Protoonkogene) aktiviert werden können, die in Verbindung mit der Entstehung von Tumoren bzw. deren Progression stehen. Interessanterweise wurden beim Lungen-, Leber-, Schilddrüsen- und Speiseröhrenkrebs rekurrente Amplifikationen der Region 14q12-q13 mit einer Häufigkeit von 7 bis 33 % gefunden, was darauf hindeutet, dass ein oder mehrere Kandidatengene aus dieser Region zur Entstehung verschiedener Tumortypen beitragen könnten. Yasui *et al.* (2001) identifizierten durch CGH-Analysen am Speiseröhrenkrebs sieben Kandidatengene der Region, darunter 5 bekannte Gene wie *BAZ1A*, *SRP54*, *NFKBIA*, *MBIP* und *HNF3A (FOXA1)*, ausgehend von der kleinsten gemeinsamen Amplifikation (~6 Mb) aller untersuchten Tumorzelllinien, die regelmäßig amplifiziert und gleichzeitig überexprimiert waren. Genau diese Gene liegen auch in dem von Tumor 86 beschriebenen Amplikon (siehe Abbildung 3.24). Es müsste untersucht werden, ob die Amplifikation auf 14q13-q21 auch beim Brustkrebs mit einer Überexpression bestimmter Gene der Region korreliert, wobei zu berücksichtigen ist, dass eine Amplifikation auf DNA-Ebene nicht zwangsläufig zu einer Genexpression führt und auch andere Mechanismen wie z. B. Methylierung dabei eine Rolle spielen.

Lin *et al.* (2002) wiesen insbesondere auf die Überexpression und Amplifikation von *FOXA1* beim Speiseröhrenkrebs hin und fanden auch eine Überexpression des Gens bei 37 % von 86 untersuchten Adenokarzinomen der Lunge. Eine Amplifikation mit einer Überexpression von *FOXA1* wurde bei zwei von fünf Lungenkarzinomen gefunden. Im Zusammenhang mit der Suche von Bindungsstellen des Östrogenrezeptors beim Brustkrebs fanden Laganieri *et al.* (2005) heraus, dass das Gen *FOXA1* für die Östrogenrezeptoren benötigt wird, um das Wachstum von Krebszellen zu aktivieren. Durch Inaktivierung von *FOXA1* wurde in Zellkulturexperimenten der wachstumsinduzierende Effekt des Östrogens unterdrückt und damit die Proliferation von Brustkrebszellen gestoppt, womit *FOXA1* als potentielles Target für therapeutische Ansätze von Interesse zu sein scheint.

Über die von Yasui *et al.* (2001) erwähnten Kandidaten *BAZ1A*, *SRP54* und *MBIP* und einen Zusammenhang zur Tumorentstehung ist bisher nur wenig bekannt. Aber z. B. *NFKBIA* gehört mit weiteren eng miteinander verbundenen Transkriptionsfaktoren zur „nuklear factor (NF)-kappa B“-Familie und ist verantwortlich für die Regulation der Expression verschiedener Gene. Über die Aktivierung des Rel/NF-kappa B Signaltransduktionsweges können Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Metastasierung angeregt werden. Bei Brustkrebs wurde aktiviertes NF-kappa B hauptsächlich in ER-negativen Tumoren mit einer Überexpression von HER-2/neu (86 %) gefunden (Biswas *et al.*, 2004), was NF-kappa B als therapeutische Angriffsstelle für diese Gruppe interessant macht. Auch könnte eine bei Brustkrebspatientinnen häufig durch aktiviertes NF-kappa B entwickelte Resistenz gegenüber Chemotherapie durch Inhibitoren verhindert werden (Montagut *et al.*, 2006).

Neben den von Yasui *et al.* (2001) erwähnten Genen befinden sich im untersuchten Amplikon des Tumors 86 (siehe Abbildung 3.24) weitere Kandidaten, die für die Tumorentstehung bedeutsam sein könnten. *EGLN3* beispielsweise fungiert als zellulärer Sauerstoffsensoren und ist bei der Regulation des hypoxie-induzierten Faktors (HIF) involviert. Sauerstoffmangel in Tumoren geht häufig mit einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegenüber Behandlungsstrategien einher. *EGLN3* ist häufig beim Lungen- und Nierenzellkarzinom hoch reguliert (Amatschek *et al.*, 2004). Das Gen *C14orf11* ist ein mit den E2F-Transkriptionsfaktoren assoziiertes Phosphoprotein (Synonym *EAPP*) und spielt bei der Regulation des Zellzyklus, Auslösung von Apoptose und Stimulation der Zellproliferation eine Rolle. Die genaue Funktion des zur „paired box“-Familie gehörenden Genes *PAX9* ist bisher noch unklar. Es ist eines von neun gut charakterisierten Transkriptionsfaktoren, die primär im Embryo, aber auch bei Tumorzelllinien der Brust, des Ovars oder der Lunge exprimiert sind und beim Wachstum und Überleben von Krebszellen benötigt werden (Muratovska *et al.*, 2003).

Laut der Datenbank für Genomische Varianten (<http://projects.tcag.ca/variation>) sind innerhalb des Amplikons auch genetische Variationen in Form von Polymorphismen im menschlichen Genom möglich. So werden vier bekannte Orte angegeben, von denen drei innerhalb regulatorischer Sequenzen von Genen (*C14orf11*, *SNX6*, *BAZ1A*, *SRP54*, *C14orf24*) liegen. Polymorphismen für die drei amplifizierten BACs und die zwei das Amplikon flankierenden BACs sind nicht bekannt. Dass es sich beim gesamten Amplikon um einen Polymorphismus handelt, ist eher unwahrscheinlich. Polymorphismen in Form von Veränderungen der Kopienzahl haben eine durchschnittliche Länge von 456 Kb und werden häufig in der Umgebung anderer chromosomaler Rearrangements gefunden, was dafür spricht, dass es sich insgesamt um eine genetisch instabile Region handelt (Sebat *et al.*, 2004).

Gough *et al.* (2003) fanden heraus, dass die virale Integrationsstelle HPV6AIL, nicht wie ursprünglich gedacht auf 10q24 sondern auf die Bande 14q13.3-q21.1 kartiert. Virale Integrationsstellen sind Stellen, an denen virale HVP-DNA bevorzugt in ein Wirtsgenom eindringen kann (z. B. beim Zervixkarzinom). Das könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass es sich insgesamt um eine recht instabile Region handelt, die anfällig für Chromosomenbrüche ist. Die konventionellen CGH-Ergebnisse der DCIS könnten dies unterstützen, da proximal zur Bande 14q21 meist Zugewinne und ab 14q22-qter eher Deletionen gefunden wurden (siehe Abbildung 3.10).

## 4.5 Immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Tumorstadien

### 4.5.1 Hormonrezeptorstatus (ER und PgR)

Beim Vergleich der Expression von ER und PgR an immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten wurden zwischen ADH, DCIS, IDC sowie LCIS und IDC meist nur geringe Abweichungen, aber in Abhängigkeit vom Kerngrad z. T. signifikante Unterschiede festgestellt (siehe Abbildung 3.20). Der aus den Farbreaktionen abgeleitete immunreaktive Score (IRS) war bei den DCIS Grad 3 im Vergleich zu den DCIS Grad 1 und IDC signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ). Es ist fraglich, ob ein Verlust der Rezeptorexpression im Verlaufe der Tumorentwicklung wieder aufgehoben werden kann. Daher stützen auch diese Ergebnisse die These von Simpson *et al.* (2005), dass sich aus DCIS mit Grad 1 invasive Tumore Grad 1 entwickeln können (siehe Abbildung 1.3). Eine Tumorprogression von DCIS Grad 1 über Grad 2 und Grad 3 zum invasiven Karzinom ist fraglich. Interessant ist, dass die ADH, die als Vorläufer der DCIS angesehen werden, im Durchschnitt als mäßig rezeptorreich (IRS 5-8) und die DCIS Grad 1 als rezeptorreich (IRS 9-12) eingestuft wurden, obwohl diese vom Kerngrad her ähnlich sind. Die geringere Expression bei den ADH könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich später daraus direkt über gut, mäßig oder schlecht differenzierte DCIS invasiv duktales Karzinome entwickeln können und die Anlage zur späteren Differenzierung bereits bei den ADH determiniert ist.

Vom invasiven Mammakarzinom ist bekannt, dass eine fehlende ER- und PgR-Expression mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist und diese Patientinnen auf eine endokrine Therapie nicht ansprechen (Putti *et al.*, 2005). Beim DCIS ist die Bestimmung der Hormonrezeptoren sinnvoll, wenn sich daraus Maßnahmen für die Behandlung ableiten, wie z. B. der Einsatz des Antiöstrogens Tamoxifen bei ER-positiven DCIS, das zu einer signifikanten Senkung der Rezidivrate führt (Daly, 2006). Auf Grund der schlechteren Prognose bei rezeptornegativen Tumoren könnte man vermuten, dass hier die Anzahl genetischer Aberrationen erhöht ist. Das dies nicht der Fall ist, zeigt die Abbildung 3.17 B, in der die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen ergänzend zur Clusteranalyse dargestellt sind. Demnach hätten sich in Cluster 3 „stark aberrant“ hauptsächlich Tumore mit negativem Rezeptorstatus wiederfinden müssen.

Die Vermutung, dass in Abhängigkeit des Rezeptorstatus spezifische Aberrationen gefunden werden, konnte nicht bestätigt werden. Beim Vergleich der DCIS Grad 2 und Grad 3 gab es eher unterschiedliche Tendenzen zwischen ER-negativen und ER-positiven Tumoren (siehe Tabelle 3.7). Lediglich bei den ER-positiven Tumoren wurde ein etwas häufigeres Auftreten von chromosomalen Verlusten auf 14q gefunden, das sowohl bei den ER-positiven DCIS Grad 2 als auch den DCIS Grad 3 vorkam. Da in jeder Gruppe nur wenige Tumorproben analysiert werden konnten (maximal 5x ER-negative und 5x ER-positive Tumore) waren Unterschiede nur als Trend

erkennbar. In der Arbeit von Scheithauer (2001) wurde beim invasiven Mammakarzinom in der Gruppe der ER-negativen Tumore eine signifikant höhere Anzahl chromosomaler Aberrationen und auch bestimmte Kombinationen, wie z. B. der gleichzeitige Verlust von 8p und 18q, gefunden als in der ER-positiven Vergleichsgruppe. Dies beides konnte für die hier untersuchten DCIS nicht gezeigt werden. Auch nach Aufteilung aller DCIS in Tumore mit prognostisch ungünstigen Eigenschaften ER-negativ und HER-2/neu-positiv und Merkmalen mit besserer Prognose ER-positiv und Her-2/neu-negativ (jeweils sechs Patientinnen pro Gruppe) wurde kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl an Aberrationen (Median 9 vs. 10) und zu klinischen Parametern, wie Tumorgröße gefunden. Allerdings gliederten sich fünf von sechs der DCIS mit Kerngrad 3 in die Gruppe mit schlechter Prognose ein. In der Gruppe ER-positiv und Her-2/neu-negativ befanden sich zwei DCIS Grad 1, drei DCIS Grad 2 und ein DCIS Grad 3.

#### 4.5.2 Zellproliferation (Ki-67)

Die Bestimmung der Zellproliferation, nachgewiesen durch die Expression von Ki-67 am Paraffinschnitt, kann Hinweise auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen geben und eine Entscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Veränderungen erleichtern. Vom invasiven Mammakarzinom weiß man, dass eine erhöhte Proliferationsaktivität der Tumorzellen oft mit einem negativem Hormonrezeptorstatus, einem höheren Kerngrad, einem aberranten Chromosomensatz und letztlich einer ungünstigeren Prognose für die Patientin verbunden ist. Auch ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose, gesteuert durch Regulationsmechanismen des Zellzyklus, stehen in engem Zusammenhang mit der Tumorprogression Meteoglu *et al.* (2005). Als Prognosemarker kann die Bestimmung von Ki-67 auch bei nicht invasivem Karzinom zur Erkennung von Patientinnen mit hohem Brustkrebsrisiko dienen.

Die hier gefundenen signifikanten Unterschiede zwischen ADH und DCIS wurden auch in der Studie von Zhou *et al.* (2009) aufgedeckt. Bei zwei ADH-Proben (103-ADH und 110-ADH) war bereits eine geringe Proliferation der Zellen erkennbar (zirka 1 % positiv gefärbte Zellen) noch ohne nachweisbare chromosomale Aberrationen in den CGH-Profilen. Denkbar ist, dass sich durch vermehrtes Zellwachstum aus diesen ADH rasch DCIS und am Ende aggressive invasive Tumore entwickeln können. Mit zunehmendem Kerngrad und mit fortschreitendem Tumorstadium von ADH über DCIS zu IDC und von LCIS zu ILC stieg die Zellproliferation an. Eine Korrelation zwischen Ki-67-Färbung und Kerngrad bei DCIS fanden auch andere Autoren (Hoque *et al.*, 2001; Lebeau *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004). Die Hypothese, dass DCIS mit assoziiertem invasivem Karzinom eine höhere Ki-67-Expression aufweisen müssten als reine DCIS bestätigte sich hingegen nicht (Hoque *et al.* (2001).

### 4.5.3 Überexpression von HER-2/neu und Vergleich zur Amplifikation mittels CGH-Techniken

Eine Überexpression des Onkoproteins HER-2/neu steht in Verbindung mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Krankheitsverlauf (Ottesen, 2003). In der hier durchgeführten Studie wurde bei 65 % der Patientinnen mit DCIS immunhistochemisch eine Überexpression von HER-2/neu (Score-Werte 2+ und 3+) festgestellt. Das ist im Vergleich zu anderen Studien recht hoch, bei denen zirka 37 % der DCIS-Patientinnen HER-2/neu positiv waren (Roses *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Korrelation zwischen HER-2/neu-Expression und Kerngrad und dem relativ hohen Anteil von DCIS Grad 3 in dieser Studie (siehe Abbildung 3.20). Die DCIS Grad 3 waren zu 90 % HER-2/neu positiv, vergleichbar mit den IDC (83 % HER-2/neu positiv) und sie waren signifikant verschieden zu den ADH (29 % HER-2/neu positiv,  $p = 0,006$ ) und den DCIS Grad 1 (50 % HER-2/neu positiv,  $p = 0,01$ ). Auch Roses *et al.* (2009) fanden eine höhere Expression bei DCIS mit hohem Kerngrad im Vergleich zu invasiven Karzinomen. Als eine mögliche Ursache geben sie an, dass HER-2/neu beim Übergang vom *in situ*- zum invasiven Karzinom hoch reguliert sein könnte und in fortgeschrittenen Tumorstadien wieder herunter reguliert wird. Sie vermuten, dass sich aus HER-2/neu positiven DCIS schneller invasive Karzinome entwickeln können. Um dies zu verhindern, empfehlen die Autoren eine gezielte Therapie. Die Wirksamkeit des Medikaments Herceptin, das derzeit nur zur Behandlung von invasivem Brustkrebs zugelassen ist, wird gegenwärtig in der NSABP-B-43 Studie auch an DCIS mit positivem HER-2/neu-Status getestet ([www.cancer.gov/clinicaltrials/NSABP-B-43](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/NSABP-B-43)).

Für HER-2/neu wurde, bezogen auf alle analysierten Proben, eine 65 %-ige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie und der konventionellen CGH gefunden. Dieser signifikante Zusammenhang ( $p = 0,005$ ) spricht dafür, dass es prinzipiell auch mit der CGH-Methode möglich ist, den HER-2/neu Status aus einem CGH-Profil abzulesen. Eine sehr viel genauere Bestimmung und eine deutlich bessere Übereinstimmung wird mit der FISH-Technik erzielt, bei der die Sonde für HER-2/neu spezifisch an die Sequenz des Gens bindet und somit die exakte Anzahl der vorliegenden Kopien durch Auszählung der FISH-Signale einzelner Zellen ermittelt werden kann. Zur Bestätigung bzw. zum Ausschluss einer *Her-2/neu*-Amplifikation ist die FISH-Technik der Goldstandard (Sauter *et al.*, 2009; Cuadros & Villegas, 2009). Daher wird die FISH-Methode häufig zur Abklärung unsicherer Immunhistochemie-Befunde, meist bei Score-Werten von 2+ beim invasiven Mammakarzinom herangezogen, um eine Entscheidung zur Therapie mit Herceptin treffen zu können.

Eine mögliche Ursache für die Abweichungen zwischen den CGH-Ergebnissen und denen der Immunhistochemie unter der Annahme, dass zwischen der Genkopienzahl und dem Expressionsniveau eine gute Korrelation besteht (Egervari *et al.*, 2008), ist die Heterogenität innerhalb des Tumors, die sich auch daran zeigte, dass bei den Schnittpräparaten nicht alle Tumorzellregionen gleichmäßig HER-2/neu -positiv gefärbt

waren. Denkbar wäre also, dass durch die Laser-Mikrodissektion in einigen Tumoren Areale mit negativem HER-2/neu-Status isoliert und diese dann mit der CGH-Technik untersucht wurden. Das würde erklären, warum *Her-2/neu* mit der CGH-Technik nur 26 Mal und mit der immunhistochemischen Färbung 33 Mal als positiv eingestuft wurde. Bei Probe 79-2 beispielsweise wurde die immunhistochemische Färbung auf Grund des Score-Wertes von 2+ als positiv bewertet, beide CGH-Messungen, Array-CGH und konventionelle CGH, waren jedoch negativ. Um einen genaueren Aufschluss über den tatsächlichen Status für *Her-2/neu* zu erhalten, müsste in solchen Fällen zusätzlich eine FISH-Analyse herangezogen werden. Beim Vergleich zwischen konventioneller und Array-CGH stimmten die Ergebnisse für *Her-2/neu* bei allen sechs analysierten Proben überein (siehe Tabelle 3.9). Auch bei zwei als HER-2/neu positiv eingestuften ADH-Proben (101-2 und 106) zeigte sich im CGH-Profil kein Zugewinn in der Bande 17q21-q22. Hier müsste das Ergebnis ebenfalls durch eine zusätzliche FISH-Analyse abgeklärt werden.

#### 4.6 DNA-zytometrische Analysen

Zur Diagnostik des Mammakarzinoms werden neben der Bestimmung immunhistochemischer Parameter und der histomorphologischen Beurteilung auch DNA-zytometrische Messungen an Tumorzellen durchgeführt. Durch Feulgen-Färbung wird die Zellkern-DNA spezifisch angefärbt, so dass der Ploidiestatus von Zellpopulationen photometrisch ermittelt und deren Malignitätspotential abgeschätzt werden kann (Böcking *et al.*, 1989; Haroske *et al.*, 2001). Die DNA-Zytometrie bietet eine einfache und sichere morphologische Identifizierung der Zellen im mikroskopischen Bild und es können praktisch alle Typen von Präparaten wie z. B. Ausstriche, Imprints, Zytospins und auch histologische Schnitte gemessen werden. Mit vergleichsweise geringem Arbeits- und Kostenaufwand kann der DNA-Gehalt von Zellen und Abweichungen vom normalen, diploiden Status ermittelt werden. Ein Nachteil bei der Auswertung der DNA-Zytometrie im Vergleich gegenüber der DNA-Durchflußzytometrie (*flow cytometry*) liegt allerdings in der relativ geringen Zellzahl pro Histogramm und der damit verbundenen statistischen Unsicherheit.

Für das invasive Mammakarzinom ist bekannt, dass Patientinnen mit diploidem DNA-Gehalt der Zellen und niedriger S-Phasefraktion eine günstigere Prognose haben als Patientinnen mit aneuploiden Tumoren und hoher S-Phasefraktion (Auer *et al.*, 1980). Diese Arbeitshypothese stimmt nur bedingt, wie an zwei Patientinnen mit invasivem Karzinom in dieser Studie gezeigt werden konnte. Bei beiden Patientinnen trat ein Rückfall der Tumorerkrankung nach 15 bzw. 44 Monaten auf. Die Zellen (Probe 4-IDC und 9-ILC) hatten einen DNA-Gehalt von 2c, also prognostisch günstig. Dies stimmte auch gut mit der geringen Anzahl an chromosomalen Aberrationen überein (zwei bzw. fünf Veränderungen). Jedoch hatten die beiden Tumore eine beachtliche Größe (größte Ausdehnung 8 bzw. 11 cm) und zeigten eine starke Überexpression von HER-2/neu (Score 3+). Für die Gesamtbeurteilung sind also neben der konventionellen

pathologischen Diagnostik und der DNA-Zytometrie auch andere Methoden wie z. B. Immunhistochemie oder chip-basierte Genexpressionsanalysen zu fordern.

Eine Korrelation zwischen der Anzahl an chromosomalen Veränderungen eines Tumors und der Ploidie wurde bereits von Ried *et al.* (1995) beschrieben. Aneuploide Tumore haben häufig eine Vielzahl numerischer und/oder struktureller Aberrationen, was im Zusammenhang mit einer erworbenen Instabilität des gesamten Genoms steht. An den hier untersuchten DCIS konnte gezeigt werden, dass diploide Tumore im Durchschnitt sechs und aneuploide DCIS durchschnittlich 13 chromosomale Veränderungen aufwiesen. Unter Berücksichtigung des Kerngrades innerhalb der DCIS wurde eine Zunahme an Aneuploidien in Tumoren von Grad 1 zu Grad 3 deutlich (siehe Tabelle 3.10). Die 5c-Exceeding-Rate (5c-ER), ein wichtiger zytomorphologischer Prognosemarker beim Mammakarzinom, betrug bei allen diploiden DCIS durchschnittlich 0,3 %, bei den DCIS mit Aneuploidien 18 %. Insgesamt waren 68 % der untersuchten DCIS aneuploid und unter ausschließlicher Berücksichtigung der DCIS mit Kerngrad 3 waren es 100 %. Das deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien zur DNA-Ploidie (Visscher *et al.*, 1996; Ottesen, 2003). Man fand heraus, dass DCIS insgesamt in mehr als 80 % der Fälle aneuploid sind und dass invasive Karzinome ähnliche Aneuploidieraten aufweisen. Auch bei invasiven Tumoren mit einer intraduktalen Komponente zeigte sich ein ähnliches Muster zwischen dem invasiven- und dem DCIS-Anteil. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Morphologie, der Immunhistochemie und Ploidie zwischen DCIS mit und ohne invasiven Charakter gefunden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die DNA-Muster invasiver Karzinome bereits im Vorstadium angelegt sind (Ottesen, 2003). Im Vergleich zu den Veröffentlichungen von Ottesen (2003) und Yildirim-Assaf *et al.* (2007) zeigt diese Studie eine deutlich niedrigere Häufigkeit von aneuploiden invasiven Tumoren (10 %). Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringe Fallzahl mit einem überrepräsentativ hohen Anteil von Tumoren mit niedrigem Kerngrad zurückzuführen.

Ausgehend davon, dass sich aus diploiden Tumoren mit nur wenigen genetischen Veränderungen im Verlaufe der Progression aneuploide Tumore entwickeln können, müssten die wenigen Veränderungen der diploiden Tumore zu den eher früheren Ereignissen zählen. Allerdings muss hierbei auch der Differenzierungsgrad berücksichtigt werden. Da die DCIS Grad 1 und Grad 2 zu 67 % diploid waren, ähnelte das Aberrationsmuster der Tumore auch sehr stark dem der DCIS Grad 1 und Grad 2. Entsprechend verhielt es sich mit den aneuploiden DCIS, die zu 77 % Kerngrad 3 aufwiesen (siehe Abbildung 3.12 und Abbildung 3.22). Anders als aneuploide DCIS zeigten zwei der diploiden DCIS Grad 2 Tumore (Probe 97 und 98) eine Amplifikation auf der Chromosomenbande 11q13. Da chromosomale Verluste auf 16q fehlen, aber weitere Amplifikationen z. B. auf 17q auftraten, ist der für high-grade Tumore charakteristische Progressionsweg wahrscheinlich (Moulis & Sgroi, 2008). Bei den aneuploiden DCIS traten in der Region 11q13 keine Zugewinne bzw. Amplifikationen auf. Im Vergleich zu den aneuploiden DCIS entwickelten die diploiden DCIS auffallend

häufiger Verluste auf 16q (67 % vs. 23 %), geringfügig häufiger auf 10q und 11q und Zugewinne auf 8q (siehe Abbildung 3.22).

Neben diesen Veränderungen wurden bei den diploiden DCIS öfters auch Zugewinne auf 1q, 17q und 20q gefunden. Da einige dieser Veränderungen mit einer recht hohen Frequenz auftraten, die z. T. über denen aneuploider Tumore lag, ist es wahrscheinlich, dass es sich hier meist um frühe Ereignisse in der Tumorentwicklung handelt. Aneuploide Tumore wiesen beispielsweise deutlich häufiger Zugewinne auf 1q ( $p = 0,025$ ), 5p, 6p und 17q und Verluste auf 4p ( $p = 0,044$ ), 8p, 14q, 17p, 18p und 18q auf. Heute weiß man, dass chromosomale Verluste auf 16q eher zu den frühen Ereignissen und beispielsweise Verluste auf 8p, 11q und Zugewinne auf 8q und 17q, einschließlich Amplifikationen zu den späten genomischen Veränderungen zählen (Roylance *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2005).

Von anderen DNA-zytometrischen Messungen an Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms ist bekannt, dass keine Unterschiede zwischen ADH und DCIS Grad 1 gefunden wurden, was für eine enge Verwandtschaft zwischen diesen Läsionen spricht (Mommers *et al.*, 2001). Die Ploidiewerte der DCIS Grad 1 ähneln denen der invasiven Karzinome mit niedrigem Kerngrad und das gleiche trifft für die DCIS Grad 3 und die invasiven Karzinome mit hohem Kerngrad zu. Dies unterstützt die Annahme, dass die Entwicklung von Brustkrebs über unterschiedliche Progressionswege erfolgt und sich gut differenzierte invasive Karzinome aus DCIS Grad 1, mäßig differenzierte invasive Karzinome über DCIS Grad 2 und schlecht differenzierte invasive Karzinome über die Stufe der DCIS Grad 3 entwickeln. Diese Hypothese wurde von mehreren Autoren beschrieben (Buerger *et al.*, 1999; Vos *et al.*, 1999; Aubele *et al.*, 2000 a; Boecker *et al.*, 2001; Buerger *et al.*, 2001; Roylance *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2005; Moulis & Sgroi, 2008). Eine Tumorgenese von ADH über DCIS Grad 1, 2 und 3 zum IDC ist fraglich. Bei der Entwicklung von normalem Brustgewebe zum invasiven Karzinom finden Veränderungen bestimmter Merkmale im Zellkern und der Chromatinstruktur statt, die in histologischen Schnittpräparaten als atypische Mitosen (CDFs - *chromosome division figures*) zu beobachten sind. Wenn sich z. B. das Zentrosom während des Zellzyklus mehr als ein Mal dupliziert, bilden sich multipolare Spindeln aus. Dies bewirkt eine Fehlverteilung der Chromosomen während der Zellteilung und damit eine ungleichmäßige Verteilung der DNA auf die Tochterzellen. Dies führt zu einer Instabilität des Genoms und somit zur Tumorentstehung. Solche atypischen Zellteilungen wurden in verschiedenen Läsionen und Tumorstadien untersucht. In Dysplasien mit niedrigem Grad und auch in gut differenzierten Karzinomen wurden nur wenige atypische Mitosen (3 bis 10 %), in höhergradigen Dysplasien 30 bis 44 % und in schlecht differenzierten Karzinomen etwa 50 % solcher Zellteilungsfiguren beobachtet (Steinbeck & Auer, 2000). Weiterhin stellten die Autoren eine Verschiebung des DNA-Gehaltes der Zellen von 2c zu 4c und eine deutliche Zunahme der 5c-ER beim Vergleich zwischen Dysplasien mit niedrigem und hohem Grad und Karzinomen fest.

Tumore mit hohem Kerngrad, einer hohen Proliferationsaktivität der Zellen, niedrigem Hormonrezeptorstatus und einer Überexpression von Her-2/neu sind mit Aneuploidie assoziiert und zeigen meist ein aggressives Wachstumsverhalten (Ottesen, 2003). Beim Vergleich der diploiden gegenüber den aneuploiden DCIS wurden diese Beobachtungen bestätigt. Dabei fanden sich die größten Unterschiede beim Vergleich der 5c-ER ( $p = 0,006$ ). Signifikant verschieden waren bei den DCIS auch die Hormonrezeptoren ER ( $p = 0,023$ ) und PgR ( $p = 0,026$ ) und die Überexpression von HER-2/neu ( $p = 0,010$ ). Beim Vergleich zwischen diploiden und aneuploiden DCIS und diploiden und aneuploiden invasiven Karzinomen wurde eine erhöhte Zellproliferation und Anzahl an Aberrationen festgestellt, die jedoch kein signifikantes Niveau erreichte (siehe Tabelle 3.11). Nicht immer korrespondierte die Ploidie exakt mit der Anzahl an Aberrationen. Möglicherweise wurden in einigen Fällen durch die Herstellung serieller Gewebeschnitte und bedingt durch die Intra-Tumorheterogenität der Proben unterschiedliche Zellklone analysiert. In den hier durchgeführten Messungen an IDC und ILC wäre eine noch höhere Rate aneuploider Tumore, zumindest ähnlich der DCIS zu erwarten gewesen.

Der meist diploide Status der invasiven Tumore stimmte allerdings weitestgehend mit der eher geringen Anzahl an Aberrationen aus dem CGH-Ergebnis überein. Möglicherweise war die Fallzahl für eine repräsentative Aussage in dieser Gruppe zu gering. Dass es sich hierbei um messtechnisch bedingte Fehler handeln könnte, ist eher unwahrscheinlich, da für die Messungen an invasiven Karzinomen ausschließlich Imprints berücksichtigt wurden und die Problematik angeschnittener Zellkerne somit entfiel. Die Interpretation von Stammlinien ist sehr spezifisch und abhängig von der Anzahl veränderter Zellen. Durch die relativ geringere Anzahl gemessener Zellen wurden möglicherweise nicht alle quantitativen DNA-Veränderungen erfasst. Daher ist es möglich, dass durch die CGH-Analyse zwar einige Veränderungen gefunden wurden, der Tumor aber trotzdem eine diploide Tumorzellpopulation im DNA-Histogramm zeigt. Die Auswertung weiterer Parameter, wie dem Anteil an Zellen in der S-Phase und G<sub>2</sub>/ M-Phase, die die Zellproliferation charakterisieren, wurde wegen der geringen Zahlen gemessener S- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen und der damit verbundenen statistischen Unsicherheit nicht berücksichtigt. Stattdessen wurde zur Abschätzung der Proliferation die Ki-67-Färbung einbezogen.

Die Beurteilung von DNA-Histogrammen ist in einigen Fällen nicht immer einfach. Da die DNA-Zytometrie ergänzend zur Histopathologie klinisch relevante und prädiktive Informationen gibt und das Ergebnis zeigt, ob ein Tumor vorliegt, ist eine Standardisierung sehr wichtig. Deshalb wurden internationale Empfehlungen zur standardisierten DNA-Messung und Interpretation der Ergebnisse festgelegt (Haroske *et al.*, 2001). In einer neueren Studie zeigten Yildirim-Assaf *et al.* (2007), dass DNA-zytometrische Messungen an Feulgen-gefärbten Imprintpräparaten prognostisch und therapeutisch relevant sein können. Die Autoren identifizierten eine Untergruppe von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom ohne Lymphknotenbefall. Die Tumorzellen zeichneten sich durch eine sehr hohe

Aneuploidierate, mehr als zehn Zellen mit einem DNA-Gehalt  $> 5c$  und mehr als eine hoch aneuploide Zelle mit einem DNA-Gehalt  $> 9c$ . Diese Patientinnen haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patientinnen der gleichen Gruppe mit niedrigerer Aneuploidierate und eine ähnlich schlechte Prognose wie Patientinnen mit Lymphknotenbefall, die weniger als zehn aneuploide Zellen  $> 5c$  aufweisen. Als Konsequenz schlagen die Autoren für diese Hochrisikogruppe ohne Lymphknotenbefall eine aggressivere Chemotherapie vor.

## **4.7 Anwendung lokusspezifischer FISH-Sonden zur Brustkrebsdiagnostik**

### **4.7.1 Eingesetzte FISH-Sonden und Funktion der überspannten Gene**

Mit Hilfe der Interphasezytogenetik ist es möglich, spezifische chromosomale Aberrationen in intakten Zellkernen durch markierte DNA-Sonden sichtbar zu machen. Im Gegensatz zur CGH-Analyse bietet diese Methode unter Verwendung von einer Auswahl genspezifischer FISH-Sonden kein genomweites Screening auf chromosomale Aberrationen, jedoch kann für eine begrenzte Anzahl von Loci (in dieser Studie acht Tumorregionen und zwei Kontrollregionen) gezielt auf Einzelzellniveau festgestellt werden, welche numerischen Aberrationen auftreten. Die Auflösungsgrenze bei diesem methodischen Ansatz beträgt zirka 100 bis 150 kb und wird durch die Größe des Inserts humaner DNA im BAC bestimmt. Die Nachweisgrenze ist daher höher als bei der konventionellen CGH-Technik, bei der die Auflösung bei etwa 5 bis 10 Mb liegt.

Zur Identifikation und Charakterisierung von Tumorzellen wurde ein vorläufiges SONDENSET generiert, das Kandidatengene aus acht wichtigen Tumorregionen einschließt. Hierzu zählen die Loci auf den Chromosomen 1q32, 8q24, 10q23, 11q13, 16q22, 17p13, 17q21 und 20q13. Es wurden jeweils zwei DNA-Sonden mit einer Kontrollsonde (für das Zentromer von Chromosom 2 bzw. Chromosom 4) in einem 3-Farben-FISH-Experiment kombiniert. Um auch Vorläuferläsionen wie DCIS und LCIS zu identifizieren, wurden Regionen einbezogen, die schon häufig in der frühen Tumorentwicklung verändert sein können (z. B. 1q32, 16q22 und 20q13), aber auch solche, die in hochmalignen Brusttumoren mit hoher Frequenz auftreten (z. B. 8q24 und 17q21). In Regionen von Onkogenen wird ein Zugewinn bzw. eine Amplifikation und in Regionen der Tumorsuppressorgene (TS-Gene) ein Verlust eines oder beider Allele erwartet. In Tabelle 4.3 werden die Gene der ausgewählten Regionen und deren biologische Bedeutung kurz vorgestellt.

**Tabelle 4.3: Ausgewählte Genregionen zur Detektion von Brustkrebs**

Dargestellt sind Gene, die durch die ausgewählten FISH-Sonden überspannt werden und für die z. T. gezeigt wurde, dass sie bei der Brustkrebsentwicklung eine Rolle spielen. Angegeben ist die Lokalisation der Gene im Genom, die Art der zu erwartenden Aberration und wichtige Funktionen.

Gen* (Referenz)	Lokalisation	Art der Aberration	Frequenz**	Genfunktion
<b>GAC1</b> (Almeida <i>et al.</i> , 1998)	1q32.1	Zugewinn/ Amplifikation	62 %	kodiert für ein Transmembranprotein der LRR (leucine-rich repeat) Unterfamilie, das wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt
<b>MYC</b> (Ioannidis <i>et al.</i> , 2003)	8q24.12- q24.13	Zugewinn/ Amplifikation	25 %	Onkogen; kodiert DNA-bindendes Protein; Transkriptionsfaktor; an zellulären Funktionen wie Replikation, Wachstum, Metabolismus, Differenzierung und Apoptose beteiligt
<b>PTEN</b> (Weng <i>et al.</i> , 2001)	10q23.31	Verlust	10 %	TS-Gen; Genprodukt hemmt Zellwachstum durch Herabsetzen von Zyklin D1; Beteiligung an der Regulation des AKT1-Signalweges; in einer Vielzahl von Tumoren mit hoher Frequenz mutiert
<b>CCND1</b> (Vos <i>et al.</i> , 1999)	11q13	Zugewinn/ Amplifikation	11 %	Onkogen; Genprodukt beteiligt an Regulation von zyklinabhängigen Kinasen (CDK); bildet einen Komplex mit CDK4 und CDK6 und reguliert Zellzyklus am G <sub>1</sub> /S-Phase Übergang; Amplifikation/Überexpression in ~50 % aller Mammakarzinome
<b>CDH1</b> (Roylance <i>et al.</i> , 2003)	16q22.1	Verlust	48 %	TS-Gen; Genprodukt gehört zu den kalziumabhängigen Zelladhäsionsproteinen; Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte; Verlust spielt eine Rolle bei der Invasion von Tumorzellen
<b>TP53</b> (Vogelstein & Kinzler, 1994)	17p13.1	Verlust	26 %	TS-Gen; kodiert einen Transkriptionsfaktor; bekannt als „Wächter des Genoms“ z. B. Blockierung des Zellzyklus für Zellen, die geschädigte DNA replizieren; Kontrolle von Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur
<b>HER-2/neu</b> (Latta <i>et al.</i> , 2002)	17q21.1	Zugewinn/ Amplifikation	36 %	Onkogen; kodiert ein transmembranales Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität, das zur Familie der Wachstumsfaktorzepetoren (EGF) gehört; therapeutisches Target (HercepTest )

<b>CYP24A</b> (Albertson <i>et al.</i> , 2000)	20q13.2- q13.3	Zugewinn/ Amplifikation	30 %	Onkogen; kodiert die Vitamin D 24-Hydroxylase; Überexpression führt zur Aufhebung der durch Vitamin D gesteuerten Wachstumskontrolle
<b>BCAS1</b> (Collins <i>et al.</i> , 1998)	20q13.2	Zugewinn/ Amplifikation	30 %	Onkogen; kodiert ein Protein mit unbekannter Funktion; in den meisten Brustkrebszelllinien überexprimiert und amplifiziert
<b>ZNF217</b> (Albertson <i>et al.</i> , 2000)	20q13.2	Zugewinn/ Amplifikation	30 %	kodiert für alternativ gespleißte „Kruppel-like“ Transkriptionsfaktoren

(\*) *Abkürzungen der Gene: GAC1 (glioma amplification on chromosome 1), MYC (myelocytoma viral oncogene homolog), PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome 10), CCND1 (cyclin D1), CDH1 (E-cadherin), TP53 (tumor protein p53), HER-2/neu, syn. ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), CYP24A1 (cytochrome P450), BCAS1 (breast carcinoma amplified sequence 1), ZNF217 (zinc finger protein 217).*

(\*\*) *Die Aberrationsfrequenz in diesen Chromosomenbanden wurde aus den gesamten CGH-Daten dieser Studie (n = 61) ermittelt.*

#### 4.7.2 Optimierung der Interphasezytogenetik und Anwendung der FISH-Sonden an Gewebeschnitten

Zur Verstärkung der Signalintensitäten wurden Contigs aus jeweils 3 BACs verwendet und zur DNA-Markierung die Nick Translation eingesetzt. Dadurch wurde eine hohe Hybridisierungseffizienz (geringe Hintergrundfluoreszenz und hohe Signalintensitäten) erreicht, die ein einfaches Auszählen der Signale ermöglichte. Die Fluoreszenzintensitäten der kommerziellen Zentromersonden und der selbst hergestellten und markierten lokusspezifischen Sonden unterschieden sich nicht voneinander. Sonden, die auf unterschiedliche Chromosomen kreuzhybridisierten (zirka 10 % aller vorab getesteten BACs), wurden von der Verwendung ausgeschlossen. Bei den kommerziellen Zentromersonden, die gelegentlich eine Kreuzhybridisierung auf andere Zentromere zeigten, konnte diese durch stringenteres Waschen der Präparate mit geringerer Salzkonzentration und höherer Temperatur der Waschlösung meist vermieden werden.

Um alle beschriebenen Regionen zu analysieren, war es erforderlich, die Signale von vier Hybridisierungsspots auszuwerten und Bilder in unterschiedlichen Z-Ebenen (Multifokusfunktion) aufzunehmen (siehe Kapitel 2.12.8). Das ist äußerst zeitaufwendig und für eine Anwendung in der Routinediagnostik ungeeignet. Bei starken Fluoreszenzsignalen kann bei zytologischen Präparaten gegebenenfalls auf die Multifokusfunktion verzichtet werden, wenn die Tiefenschärfe des Objektivs durch kleinere numerische Aperturen erhöht wird. In einem Vergleich wurde festgestellt, dass wegen der geringeren Objektstärke bei Imprints und Zytospinpräparaten die Multifokusaufnahme nicht unbedingt erforderlich ist und ein Einzelbild pro Filter

ausreicht. Die Anzahl an Signalen wurde gleich gut erfasst, und es gab keine signifikanten Unterschiede der Zählergebnisse bei einem Vergleich der beiden Aufnahmetechniken. Für eine routinemäßige Anwendung wäre zusätzlich ein Bildaufnahmesystem von Vorteil, das Fotos vom gesamten Hybridisierungsgebiet automatisch aufnimmt. Mikroskope dieser Art befinden sich auf dem Markt. In Ergänzung dazu wurden spezielle Programme entwickelt, die ein automatisches Auszählen von FISH-Signalen ermöglichen. Dadurch kann Zeit eingespart und subjektive Fehler vermieden werden. An Schnittpräparaten ist diese Anwendung sicher noch schwierig, weil die Abgrenzung benachbarter Interphasekerne oft problematisch ist. Der Einsatz direkt markierter Sonden würde den Vorteil ergeben, dass aufwendige Detektionsschritte entfallen und störende Hintergrundfluoreszenz reduziert werden könnte. Allerdings sind die Signalintensitäten häufig gegenüber indirekt markierten Sonden schwächer und nicht immer für alle Präparatetypen (z. B. Gewebeschnitte) geeignet.

Eine spezielle Herausforderung ist die Hybridisierung von FISH-Sonden auf Gewebeschnitte. Kritisch dabei ist die Vorbehandlung der Präparate, insbesondere der Schritt des Pepsinverdaus (siehe Kapitel 2.12.2). Ist die Behandlungsdauer zu kurz, finden die Sonden nicht ihre Zielsequenzen oder die Hintergrundfluoreszenz erschwert das Auszählen der Signale. Bei zu langer Inkubation werden die Kerne zu stark angegriffen, so dass gar keine Signale mehr zu sehen sind. Ein weiteres Problem ist, dass Zellkerne oft angeschnitten sind und häufig nicht alle Signale eines Kerns erfasst werden, also Verluste vorgetäuscht werden. Die optimale Schnittdicke ist abhängig von der Größe der Zellkerne und vom Tumortyp. Bei dickeren Schnitten von ca. 10  $\mu\text{m}$  sind die Kerne zwar nicht so häufig angeschnitten, lösen sich aber häufig während der Behandlung vom Objektträger ab. Dazu kommt, dass bei dicken Schnitten oft mehrere Zellen übereinander liegen und dann die Zuordnung von Signalen zu den unterschiedlichen Kernen schwierig ist. Die Bildaufnahme sollte daher in verschiedenen Fokusebenen erfolgen. Um die aufgeführten Schwierigkeiten bei Schnittpräparaten zu umgehen, ist es günstig, zytologische Präparate wie z. B. Imprints oder Zytospinpräparate zu verwenden. Dadurch können die Sonden besser zu ihren Bindungsstellen gelangen und die Fluoreszenzsignale meist gut ausgezählt werden. Falls zytologische Präparate nicht zur Verfügung stehen und auf Formalin fixiertes Gewebe zurückgegriffen werden muss, aber ausreichend Material zur Verfügung steht, können die Tumorzellen alternativ auch enzymatisch durch Protease aus dem Gewebeverband herausgelöst und als Suspension auf einen Objektträger aufgebracht werden.

#### **4.7.3 Spezifität des verwendeten FISH-Sonden-Mix**

Die hier in Kontrollexperimenten ermittelte Hybridisierungseffizienz der FISH-Sonden von 97 % in Referenzpräparaten entspricht den aus Veröffentlichungen bekannten Angaben (Heselmeyer-Haddad *et al.*, 2002). Unter Anwendung des generierten SONDENSETS konnten Tumorzellen in unterschiedlichen Tumortypen und an

verschiedenen Präparaten nachgewiesen werden. Bei den in Tabelle 3.15 untersuchten DCIS und IDC wurde mindestens eine und maximal zehn aberrante Regionen gefunden, so dass diese Tumore durch Interphase-FISH als Brustkrebs positiv eingestuft werden konnten. Die vier Imprintpräparate von Patientinnen mit fibrozystischer Mastopathie, einer benignen Gewebeveränderung der Brust, wurden als negativ für Brustkrebs charakterisiert, da keine numerischen Aberrationen gefunden wurden.

Bezogen auf die eigenen CGH-Ergebnisse von Tumoren unterschiedlicher Histologie wurde berechnet, dass allein mit dem generierten FISH-Sondenset etwa 90 % der Brusttumore identifiziert werden könnten. Unter zusätzlicher Berücksichtigung immunhistochemischer Parameter könnten alle Tumore vollständig erfasst werden (siehe Abbildung 3.27). Der Nachweis von Aberrationen für die einzelnen Tumorgruppen ist recht unterschiedlich (siehe Tabelle 3.16). DCIS Grad 3, LCIS und IDC hatten eine Detektionsrate von 100 %, während Läsionen wie ADH und DCIS Grad 1 auf Grund der geringeren Anzahl an Aberrationen, die oft sporadisch auftreten und nicht in den ausgewählten Regionen liegen, nicht so häufig erfasst wurden (Detektionsrate für ADH 40 % und für DCIS Grad 1 75 %).

Da das Auflösungsvermögen von FISH-Sonden größer ist als das der konventionellen CGH-Technik und die Analyse auf Einzelzellniveau stattfindet, ist es denkbar, dass in kleinen Genombereichen oder Tumorzellsubpopulationen, die Veränderungen mit konventioneller CGH nicht erfasst, jedoch durch FISH-Sonden detektiert werden können. Einen Hinweis auf diese höhere Sensitivität der FISH-Analyse geben die Ergebnisse in Tabelle 3.15. Mittels FISH-Technik wurden für die betreffenden Tumorregionen signifikant mehr Patientinnen mit Aberrationen ermittelt als durch CGH ( $p = 0,020$ ). Ein limitierender Faktor bei der FISH-Analyse besteht darin, dass kein genomweites Screening möglich ist und nur die häufigsten bei Brustkrebs veränderten Regionen analysiert werden können. Die Aberrationen sind insgesamt sehr heterogen und befinden sich nicht immer im gleichen Chromosomenabschnitt. So ist es möglich, dass beispielsweise bei Probe 2-IDC mit der Sonde für 17q12-q21 durchschnittlich 2 Signale pro Kern ermittelt wurden, aber die weiter zum Telomer gelegene Amplifikation von 17q22-qter nicht erfasst wurde (siehe Abbildung 3.26).

Die verschiedenen Subtypen der *in situ*- und invasiven Karzinome teilen verschiedene Aberrationen miteinander. Es sind jedoch keine spezifischen Deletionen bzw. Duplikationen erkennbar, die eine zuverlässige Unterscheidung zwischen einer atypischen Hyperplasie, einem Carcinoma *in situ* und einem invasivem Karzinom ermöglichen. Zum Beispiel der gleichzeitige Zugewinn von 1q und der Verlust von 16q tritt zu einem hohen Prozentsatz bei den LCIS auf, wird aber insbesondere auch bei den gut differenzierten DCIS beobachtet. Daher können mit Hilfe der FISH-Sonden zwar Tumorzellen auf molekularer Ebene erkannt und charakterisiert werden, aber eine verlässliche stadienspezifische Zuordnung zu einem Tumortyp, wie beispielsweise ein Zugewinn des langen Arms von Chromosom 3, der als genetischer Marker für die Progression von einer Dysplasie zum Karzinom beim Gebärmutterhalskrebs

identifiziert wurde, ist nicht gegeben (Heselmeyer *et al.*, 1996; Heselmeyer-Haddad *et al.*, 2003).

Wichtig ist, durch eine Kontrollsonde festzustellen, wie der Ploidiegrad einer Zelle ist, um besser Zugewinne von Amplifikationen unterscheiden zu können. Bei hoch aberranten Tumoren kann das allerdings schwierig sein. Daher ist es günstig, wenn von der lokusspezifischen Sonde und vom Zentromer des gleichen Chromosoms je eine Sonde zusammen hybridisiert werden, wie z. B. beim kommerziellen FISH-Test für HER-2/neu. Aus dem Signalverhältnis lässt sich ermitteln, ob eine Amplifikation vorliegt. Dieser Test eignet sich zur Beurteilung von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom, die für eine Behandlung mit dem Medikament Herceptin in Betracht kommen, jedoch nicht für ein generelles Screening, um Brustkrebs zu diagnostizieren.

#### 4.7.4 Optimierung des FISH-Sondensets und dessen Grenzen

Das generierte Sondenset kann bezogen auf die eigenen Daten zirka 90 % aller Patientinnen mit Brustkrebs identifizieren. Es ist aber in der so entwickelten Form aus den oben beschriebenen Gründen für die Routine noch nicht anwendbar. Es wurde anhand der eigenen CGH-Ergebnisse ermittelt, dass etwa 75 % der Tumore allein durch die 1q32- Sonde detektiert werden könnten. Bezogen auf die CGH-Ergebnisse von 811 Brusttumoren, die in der Datenbank „Progenetix“ ([www.progenetix.net](http://www.progenetix.net)) im Internet veröffentlicht sind (Baudis, 2000; Baudis & Cleary, 2001) würden 43 % der Tumore mit einer Überrepräsentation von 1q32.1 detektiert werden. Anhand der eigenen Daten wurde gezeigt, dass insgesamt bereits vier statt der verwendeten acht tumorrelevanten Sonden ausreichen würden, um Brustkrebs zu diagnostizieren, ohne dass sich die Detektionsrate verringern würde (siehe Abbildung 3.27). Durch die Sonden 10q23 und 11q13 wurden jeweils nur 14 % der Tumore identifiziert. Bei Ausschluss beider Sonden würden trotzdem alle Tumore dieser Studie gefunden werden, da meist mehrere Aberrationen gleichzeitig vorliegen, die dann durch andere Sonden erfasst würden. Bezogen auf die in der Datenbank von „Progenetix“ erfassten *in situ*- und invasiven Karzinome würden unter Ausschluss der Sonden 10q23 und 11q13 zirka 85 % aller Tumore in einem diagnostischen Test mittels FISH-Sonden erkannt werden. Interessant wäre auch eine Reduzierung des vorläufigen Sets auf fünf Sonden, um diese in einer einzigen 5-Farben-FISH Hybridisierung effizient einzusetzen, ähnlich eines kommerziell erhältlichen Hybridisierungskits (Multivision Polar Body, Fa. Abbott). Wie aus Abbildung 3.27 deutlich wurde, sind die vier Sonden 1q32, 16q22, 17q21 (*HER-2/neu*-Region) und 20q13 bereits ausreichend. In Ergänzung dazu könnte als Kontrollsonde eine Zentromersonde für Chromosom 17 eingesetzt werden. Dadurch erhält man einen FISH-Test zur Brustkrebsdiagnostik, der gleichzeitig den Herceptin-Test mit einschließt. Alternativ könnte man eine zweite Zentromersonde zur Kontrolle der Ploidie hinzufügen und zwei Hybridisierungsrunden mit jeweils drei Sonden (zwei Tumorregionen und eine Kontrolle) durchführen. Der Nachweis von Tumorzellen mittels FISH-Sonden wäre allerdings nur in Verbindung mit anderen diagnostischen und prognostischen Markern sinnvoll, da auf Grund der

Heterogenität der Brusttumore keine 100 %-ige Detektionsrate mittels FISH-Sonden allein möglich ist. Es können durch einen Diagnostiktest mittels FISH-Sonden nur spezifische Regionen der häufigsten rekurrenten Veränderungen berücksichtigt werden. Als nächster Schritt wäre eine Validierung des FISH-Sondensets an einer größeren Anzahl von Brusttumoren unterschiedlicher Stadien erforderlich.

#### **4.7.5 Mögliche Anwendungsgebiete des generierten FISH-Sondensets**

Der Einsatz der generierten FISH-Sonden ist an unterschiedlichen Typen von Präparaten, vorzugsweise an zytologischen Präparaten und zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen möglich. In den hier durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass eine Hybridisierung der FISH-Sonden auf Imprints und Zytopinpräparate, bei denen die aus frischem OP-Material aspirierten Zellen als Suspension durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht wurden, sehr gut möglich ist. Weiterhin kann das Sondenset auch eingeschränkt an Gewebeschnitten angewendet werden.

In der Praxis könnte das Sondenset zum Tumorzellnachweis an Feinnadelaspiraten Anwendung finden. Die Feinnadelaspiration ist eine minimal invasive Punktionsmethode zur Abklärung bei Verdacht auf Brustkrebs, die bereits in Schweden erfolgreich durchgeführt wird. Im Gegensatz zur Stanzbiopsie wird bei der Feinnadelpunktion Tumorgewebe mit einer dünnen Kanüle durch ein geringes Vakuum aspiriert, so dass die Verletzung von Gefäßen um ein Vielfaches geringer ist. Sie ist schmerzarm und bedarf keiner lokalen Betäubung. Da allerdings nur wenige Zellen aspiriert und zytologisch ohne histologische Absicherung untersucht werden können, erfordert die sichere Diagnosestellung viel Erfahrung und ist nur durch besonders geschulte Pathologen möglich. Das Hauptproblem besteht in der Unterscheidung zwischen nicht invasiven und invasiven Veränderungen. Mit Hilfe des Sondensets könnte die Diagnostik von Feinnadelaspiraten, unabhängig von anderen Markern verbessert werden. Dies wurde bereits in anderen Studien gezeigt, bei denen kommerziell erhältliche lokus- und zentromerspezifische FISH-Sonden für verschiedene Chromosomen an invasiven Brusttumoren und auch an DCIS eingesetzt wurden (Komoike *et al.*, 2000; Heselmeyer-Haddad *et al.*, 2003).

Derzeit wird durch die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Senologie und auch für die Zertifizierung von Brustkrebszentren gefordert, dass bei Verdacht auf ein Mammakarzinom eine Gewebeentnahme z. B. mittels Stanzbiopsie und deren histologische Evaluierung erfolgen soll. Die Feinnadelaspiration, bei der der Gewebeverband nach der Punktion nicht mehr erhalten ist, kann in Kombination mit lokusspezifischen FISH-Sonden zur Präzision der Diagnostik daher gegenwärtig in Deutschland nicht als Alternative zur Stanzbiopsie betrachtet werden. Als kritisch zu betrachten ist eine Anwendung des vorläufigen FISH-Sondensets an limitiertem Biopsiematerial oder fixiertem Gewebe mit einer kleinen Tumorregion, da bei Hybridisierung aller Sonden des Sets vier separate Hybridisierungsgebiete auf mehreren Objektträgern benötigt werden.

Eine zweite praktische Anwendungsmöglichkeit der Interphasezytogenetik mittels generierter FISH-Sonden wäre in Ergänzung zum immunzytochemischen Nachweis von disseminierten Tumorzellen möglich. Der Nachweis gestreuter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut ist vor allem bei metastasierenden Brusttumoren von prognostischer Relevanz und wurde vor einigen Jahren als zusätzlicher Faktor mit in die pTNM-Klassifikation aufgenommen und getrennt bewertet. Deren Nachweis ist vor allem zur Therapiekontrolle und zur Erkennung von Rezidiven wichtig und erfolgt durch Isolierung und Anreicherung zirkulierender Epithelzellen mittels immunomagnetischer Zellseparation mit Zytokeratin-Antikörpern. Eine eindeutige Identifikation disseminierter Tumorzellen ist bedingt durch unspezifische Antikörperbindungen oftmals nicht möglich (Borgen *et al.*, 1998). Daher wurden von einer internationalen Studiengruppe Richtlinien zur standardisierten Auswertung immunhistochemisch gefärbter Präparate von Tumorzellen aus dem Knochenmark bzw. Blut erarbeitet (Borgen *et al.*, 1999).

Neben diesen morphologischen Kriterien könnte der Einsatz der FISH-Sonden eine Aussage liefern, ob es sich um Tumorzellen oder Färbeartefakte handelt und das Therapiemonitoring verbessern. Umfangreiche Studien wurden bereits mit kommerziellen, meist zentromerspezifischen FISH-Sonden erfolgreich durchgeführt, in denen die Aberrationsmuster von disseminierten Tumorzellen bestimmt und mit dem Primärtumor verglichen wurden und deren Malignitätspotential abgeschätzt wurde (Ghadimi *et al.*, 2001; Fehm *et al.*, 2002). Ein zusätzlicher Vorteil von lokusspezifischen Sonden wäre, dass vermehrt Aberrationen in über- bzw. unterrepräsentierten Chromosomenabschnitten wie z. B. Zugewinne auf 1q erfasst werden könnten. Durch den alleinigen Einsatz von Zentromerproben wäre dies nicht möglich.

Eine dritte Möglichkeit ist der Einsatz der FISH-Sonden an biologischen Flüssigkeiten, wie z. B. an Spülungen des Milchgangsystems der Brust (*ductal lavage*), in denen sich hunderte abgeschürfte Epithelzellen befinden. Solche Aspireate werden durch einen in die Brust eingeführten Mikrokatheter gewonnenen. Aus dem resuspendierten Zellpellet können ausreichend Präparate hergestellt werden, indem die Zellsuspension auf Objektträger getropft wird. In der Studie von King *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass die mittels Interphasezytogenetik nachgewiesenen Aberrationen im Aspirat solcher Spülungen nicht immer mit dem Primärtumor korrespondierten und gerade bei größeren Läsionen die Tumorzellen eher in umliegendes Gewebe streuen als das diese in das duktales System abgegeben werden. Daher ist eine zuverlässige Brustkrebsdiagnostik an Spülungen des Milchgangs nicht möglich.

## 4.8 Ausblick

Die Untersuchung verschiedener Brustkrebsstadien auf zytogenetischer und molekularer Ebene wird auch zukünftig von großer klinischer Bedeutung sein. Insbesondere die Erfassung prognoserelevanter Gensignaturen, die zur Verbesserung und Entwicklung neuer wirksamerer Therapien dienen könnten, ist von großem Interesse. Hierbei kann die Array-CGH-Technologie in Kombination mit klassischen histopathologischen und klinischen Methoden eine herausragende Rolle spielen.

Derzeit wird die konventionelle CGH-Methode immer mehr durch die Array-CGH-Technik abgelöst. Ein limitierender Faktor bei der konventionellen CGH-Methode zum genomweiten Screening war die im Vergleich zur Array-CGH-Technik geringere Auflösung von etwa 10 Mb, bei Amplifikationen zirka 5 Mb und der geringere Probendurchsatz. In Abhängigkeit von der Anzahl der zur Verfügung stehenden DNA-Klone auf einem DNA-Chip besteht die Möglichkeit, genetische Veränderungen auch auf Genebene zu detektieren. Dabei müssen diese Klone in ihrer Sequenz überlappend sein, damit bestimmte Regionen oder das gesamte Genom vollständig abgedeckt werden. Dennoch ist es schwierig, einzelne Gene direkt mit dem Brustkrebsgeschehen in Verbindung zu bringen, da meist größere chromosomale Regionen, die viele Gene umfassen, hinzugewonnen oder deletiert sind.

Die Auflösungsgrenzen des in dieser Studie verwendeten 6.000 BAC-Arrays ist zirka 0,6 Mb, d. h. Aberrationen mit einer Größe unter 600 kb können nicht detektiert werden. Um das gesamte humane Genom lückenlos abzudecken, wurden hochauflösende Microarrays hergestellt, die zirka 32.000 in ihrer Sequenz überlappende BACs umfassen (Ishkanian *et al.*, 2004). Die Herstellung dieser Arrays ist jedoch äußerst zeitintensiv und teuer. Ein routinemäßiger Einsatz in der Diagnostik ist auf Grund der Kosten und der weiterhin eingeschränkten Auflösung von 150 kb nicht realisiert worden.

Mittlerweile werden anstelle von BACs Oligonukleotide als Targets zur Herstellung von Arrays benutzt. Oligonukleotide bieten eine höhere Flexibilität, sie können schneller, kosteneffizienter und mit unbegrenzter Auflösung synthetisiert werden. Die neuesten Plattformen umfassen 1 - 2,3 Millionen Oligonukleotide und erzielen eine genomweite Auflösung unter 10 kb. Ein weiterer Vorteil der so genannten Oligo-Arrays ist die Möglichkeit des direkten Vergleichs von RNA-Expression und Veränderungen der Kopienzahl auf DNA-Ebene. Ein Problem bei der Auswertung sind die vergleichsweise geringeren Fluoreszenzintensitäten und die damit verbundene erhöhte Streuung der Werte, insbesondere bei nicht optimalem Ausgangsmaterial. Daher ist derzeit noch unklar, ob amplifizierte DNA, isoliert aus formalinfixiertem Gewebe, den Qualitätsanforderungen genügt und zur routinemäßigen Hybridisierung auf Oligo-Arrays geeignet ist. Durch Verwendung von kryokonservierten Gewebeproben wird die Fragmentation und Zerstörung der DNA verhindert, wodurch eine höhere Qualität der gewonnenen DNA und eine bessere Auswertbarkeit der Daten erreicht wird. Weiterhin könnte vom gleichen Gewebe RNA isoliert werden, so dass auch Untersuchungen zur

Genexpression mit größerem Probendurchsatz möglich sind. Eine Überprüfung der Ergebnisse, insbesondere von Aberrationen unter 100 kb, ist schwierig, da eine FISH mit Oligonukleotiden zur Kontrolle nicht möglich ist und BACs als Sonden zu groß sind. Als alternative Methode kann für die Überprüfung eine quantitative Real-Time PCR eingesetzt werden, die jedoch bei nachgewiesenen Duplikationen keine Informationen zur Lokalisation des duplizierten Fragmentes liefert.

Wichtige Voraussetzungen für einen routinemäßigen Einsatz der Microarray-Technik in der Klinik sind die Standardisierung von Experimenten, einschließlich der Verwendung validierter Arrays, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und eine vereinheitlichte Verarbeitung der komplexen Daten durch bioinformatische Methoden und der Ausschluss von Polymorphismen. In Kombination mit anderen Techniken wie z.B. Tissue-Microarrays, der Erfassung epigenetischer Modifikationen durch Aufdeckung pathologischer DNA-Hypermethylierungsmuster kann die Testung an größeren Patientenkollektiven die klassische histopathologische Prognose unterstützen und zur Identifizierung neuer prädiktiver und prognostischer Marker dienen, um neue wirkungsvolle Medikamente zu entwickeln und eine effiziente individuelle Therapie zu ermöglichen.

Die neuesten Entwicklungen im Bereich der Sequenziertechnologien („*next generation sequencing*“) ermöglichen die Sequenzierung von kompletten Genomen in relativ kurzer Zeit. In einem internationalen Konsortium werden die Genome von 50 verschiedenen Tumorarten analysiert mit dem Ziel, spezifische Mutationen zu identifizieren, die für die jeweilige Tumorart ursächlich sind. Langfristiges Ziel ist u. a. die Entwicklung von Bluttests im Sinne einer personalisierten Medizin. Diese Tests sollen für das Monitoring von Rezidiven bei Patienten eingesetzt werden, die bereits eine Operation oder Chemotherapie erhalten haben.

## 5 Zusammenfassung

Durch ein verstärktes Mammographie-Screening in den letzten Jahren werden neben den bereits gut untersuchten invasiven Karzinomen vermehrt *in situ*-Karzinome nachgewiesen, deren Inzidenz bezogen auf alle im Rahmen dieser Vorsorgeuntersuchungen erfassten Läsionen auf etwa 20 % geschätzt wird. Es handelt es sich hierbei meist schon um entartete Zellen, die als Krebsvorstufen gelten und aus denen sich bei Nichtbehandlung ein invasives Karzinom entwickeln kann. Daher ist die Aufdeckung genetischer Veränderungen in frühen Vorläuferstadien wichtig und könnte zu einem besseren Verständnis der Tumorentwicklung und einer verbesserten Diagnostik beitragen, um eine auf die Patientin optimal abgestimmte Therapie zu ermöglichen.

Ausgehend von formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Geweben, das z. T. mehrere Jahre alt ist, konnten mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion wenige Millimeter große, histologisch definierte Zellareale exakt separiert und diese mittels CGH-Techniken auf ihre genetischen Veränderungen analysiert werden. Zur Vervielfältigung der isolierten genomischen DNA vor der CGH-Analyse war die Ligations-PCR nach Klein *et al.* (1999) am besten geeignet. Bei zehn untersuchten Patientinnen mit einer ADH wurden nur sehr vereinzelt Aberrationen aufgefunden (z. B. -16q und +20q). 15 Patientinnen mit einem LCIS zeigten Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q (87 %), 6p (40 %), 17q (40 %) und 20q (33 %) sowie Verluste auf 16q (73 %) als charakteristische Veränderungen. Die Analyse von 23 Patientinnen mit einem DCIS ergab sehr komplexe Aberrationen, die denen der IDC ähnelten, wie häufige Zugewinne auf den Chromosomenabschnitten 1q (61 %), 6p (35 %), 8q (43 %), 17q (65 %), 20q (39 %) und Verluste auf 8p (52 %), 10q (30 %), 16q (39 %), 17p (43 %) und 18p (30 %). Amplifikationen traten vermehrt auf den Chromosomenarmen 1q (17 %), 14q (13 %), 17q (43 %) und 20q (26 %) auf. Die Region 17q21, in die das Onkogen *Her-2/neu* kartiert, welches ein hohes Malignitätspotential besitzen kann, war bereits bei den *in situ*-Karzinomen (Frequenz DCIS zirka 60 %; Frequenz LCIS zirka 40 %) häufig durch Amplifikationen aufgefallen. Bei sieben Patientinnen mit einem IDC wurden Amplifikationen in der Region 1q32 entdeckt und für sechs Patientinnen mit einem ILC waren Zugewinne auf den Chromosomenarmen 1q und 16p charakteristisch.

Die Detektion genetischer Veränderungen in als morphologisch „normal“ eingestuften Epithelzellen bei 2 von 13 laser-mikrodissezierten Gewebeproben in näherer Umgebung vom Tumor war überraschend und könnte für die Patientin schwerwiegende Folgen haben. Würden nach der Entfernung eines Tumors wenige genetisch veränderte Zellen, die aber morphologisch als solche nicht erkennbar sind in der Brust verbleiben, könnten diese zur Bildung eines Rezidivs, das auch invasiv sein kann, beitragen. Um das zu verhindern, ist ein ausreichend großer, von Tumorzellen

freier Resektionsrand notwendig. Eine Kombination aus histopathologischer und genetischer Analyse wäre daher sinnvoll.

Durch hierarchische Clusteranalyse wurden alle durch CGH analysierten Proben anhand ähnlicher Aberrationsmuster unabhängig vom Tumortyp in fünf Hauptgruppen zusammengefasst. So wurden z. B. hoch aberrante Tumore, meist DCIS Grad 2 und Grad 3 dem Cluster 3 zugeteilt und DCIS Grad 1 und LCIS mit Zugewinnen chromosomalen Materials auf 1q und gleichzeitigem Verlust auf 16q dem Cluster 4.

Es wurde an ausgewählten DCIS gezeigt, dass die Ergebnisse der konventionellen CGH mit der Array-CGH-Technik mittels eines zirka 6.000 BACs umfassenden DNA-Chips (Auflösung etwa 0,6 Mb) reproduziert und zusätzliche Veränderungen detektiert werden können. Die Amplifikation der Bande 14q12 bei Tumorprobe 86 wurde bestätigt und auf eine Größe von 3,2 - 5,6 Mb eingegrenzt. In diese Region kartieren 24 Gene, deren potentielle Bedeutung zur Entstehung von Brustkrebs bisher unbekannt ist. Daher wären weiterführende Analysen z. B. zur Genexpression notwendig, um herauszufinden, welche dieser Gene als Onkogen-Kandidaten für die Tumorgenese verantwortlich sein können. Prinzipiell muss bei der Array-CGH-Analyse von Tumor-DNA aus Paraffinmaterial berücksichtigt werden, dass die Qualität der Ausgangs-DNA gegenüber unfixierter DNA, z. B. aus frischem OP-Material oder kryokonserviertem Gewebe, vermindert ist. Weiterhin werden durch die genomische Amplifikation der fixierten DNA zusätzliche Streuungen der Einzelwerte verursacht, so dass nicht jede Probe uneingeschränkt ausgewertet werden kann. Für einen routinemäßigen Einsatz der Array-CGH-Methode mit fixierter DNA in der Klinik ist es derzeit wegen einer unzureichenden Standardisierung noch zu früh.

Um frühe Brustkrebsstadien zu diagnostizieren, könnten neben bekannten Prognosemarkern wie z. B. ER, PgR, HER-2/neu, Ki-67 und Ploidiestatus spezielle FISH-Sonden als Ergänzung zur histopathologischen Diagnostik eingesetzt werden. Dabei muss im Vergleich zur CGH-Technik berücksichtigt werden, dass häufige rekurrente Aberrationen mit einzelnen Sonden zwar mit einer höheren Empfindlichkeit erfasst, aber nicht das gesamte Genom analysiert werden kann. Mit Hilfe selbst hergestellter, lokusspezifischer FISH-Sonden für die Regionen 1q32, 16q22, 17q21 und 20q13 würden bezogen auf die eigenen CGH-Daten 90 % aller Brusttumore, einschließlich der *in situ*- und invasiven Karzinome identifiziert werden. Auch in Zukunft werden die Einteilung von Tumorerkrankungen in klinisch relevante Subgruppen anhand pathologischer und molekularer Marker und die Identifizierung von Prognosefaktoren von Bedeutung sein, damit eine effiziente individuelle Therapie möglich sein wird.

## 6 Summary

The intensive mammographic screening program in the last years has led to the detection of well investigated invasive carcinomas and also to the finding of an increased number of *in situ* carcinomas, whose incidence is estimated at 20 %. These lesions consist usually of abnormal cells and may lead to the development of invasive carcinoma if left untreated. The detection of genetic alterations in early lesions is, therefore, important and could contribute to a better understanding of tumor progression for improved diagnostics and for individualized therapeutic strategies.

Using laser microdissection of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, small histologically defined cell areas, just millimeters in size, could be investigated with CGH techniques for detection of copy number changes. Ligation mediated PCR according to Klein *et al.* (1999) was optimally adapted for amplification of isolated genomic DNA before CGH analysis. Ten patients with ADH showed only sporadic chromosomal aberrations (-16q and +20q). 15 cases with LCIS had gains including chromosomes 1q (87 %), 6p (40 %), 17q (40 %) and 20q (33 %) and also losses of 16q (73 %) as typical genetic changes. The analysis of 23 patients with DCIS resulted in highly complex aberrations, which are comparable with those of invasive carcinomas, involving recurrent aberrations such as gains of chromosome arms 1q (61 %), 6p (35 %), 8q (43 %), 17q (65 %), 20q (39 %) and losses of 8p (52 %), 10q (30 %), 16q (39 %), 17p (43 %) and 18p (30 %). Amplifications were frequently seen on chromosomal arms 1q (17 %), 14q (13 %), 17q (43 %) and 20q (26 %). The region 17q21, known to contain the oncogene *Her-2/neu*, which is characterized as having a high malignancy potential, was often amplified in *in situ* carcinomas (frequency DCIS ~60 %, LCIS ~40 %). In seven patients with IDC, amplifications were detected in the region of 1q32 and also six ILC patients showed typical gains on chromosomal arms 1q and 16p.

Genetic changes were surprisingly found in 2 of 13 laser-microdissected tissue samples from epithelial cells classified as “normal”, found near the tumor cells, which could lead to a more severe outcome among patients. In these cases, a few abnormal cells are overlooked due to their normal morphological appearance and remain in the breast after excision of the tumor. This may lead to the occurrence of relapse and invasive cancer. To avoid this, a sufficient resection margin, free of tumor cells, is required. A histopathological diagnosis as well as a genetic analysis would therefore be advisable.

Applying hierarchical cluster analysis, all CGH analyzed samples were clustered according to similar patterns of alterations independent of tumor type and summarized into five main groups. Thus, highly aberrant tumors, most of them intermediate- and high-grade DCIS, were grouped into cluster 3 and low-grade DCIS and LCIS with gains of chromosomal material of 1q and corresponding loss of 16q into cluster 4.

As shown from selected DCIS samples, conventional CGH results could be reproduced applying a 6,000-BAC array (resolution ~0.6 Mb). Additional alterations were also detected. The amplified region on band 14q12 in tumor sample 86 was confirmed and narrowed down to a size of 3.2 - 5.6 Mb. Twenty four genes are located in the region and their relevance for breast cancer progression has not yet been investigated. Gene expression studies are necessary to determine, which of these genes are putative oncogene and could be responsible for tumor progression. Consideration should be taken using this approach as the quality of tumor DNA extracted from paraffin-embedded tissue is reduced compared to that of DNA from fresh or frozen tissue samples. Furthermore, amplification of fixed genomic DNA can lead to an increased standard deviation of data, and not all samples should be included in the evaluation. Due to this insufficient validation of data it is still too early for the routine use of array CGH to analyze paraffin-embedded tissue.

To diagnose early breast cancer lesions, in addition to using well-established prognostic markers such as ER, PgR, HER-2/neu, Ki-67 and DNA ploidy status, specific FISH probes could be applied for histopathological diagnostics. It should be considered that common recurrent aberrations can be detected with higher sensitivity with specific FISH probes. However, this technology does not allow for a genome-wide analysis. Using custom-generated FISH probes from different chromosomal loci such as 1q32, 16q22, 17q21 and 20q13, 90 % of the breast cancer cases in our study including *in situ*- and invasive cancer could be identified. In the future, the classification of tumor lesions into clinically relevant subgroups using pathological and molecular markers and the identification of prognostic factors will be important to enable an efficient personalized therapy.

## 7 Literaturverzeichnis

- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Albertson, D. G., Ylstra, B., Segraves, R., Collins, C., Dairkee, S. H., Kowbel, D., Kuo, W. L., Gray, J. W., & Pinkel, D. (2000): Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25, 144-146.
- Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F., & Gray, J. W. (2003): Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34, 369-376.
- Almeida, A., Zhu, X. X., Vogt, N., Tyagi, R., Muleris, M., Dutrillaux, A. M., Dutrillaux, B., Ross, D., Malfoy, B., & Hanash, S. (1998): GAC1, a new member of the leucine-rich repeat superfamily on chromosome band 1q32.1, is amplified and overexpressed in malignant gliomas. *Oncogene* 16, 2997-3002.
- Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K. H., *et al.* (2004): Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64, 844-856.
- Aubele, M., Mattis, A., Zitzelsberger, H., Walch, A., Kremer, M., Hutzler, P., Hofler, H., & Werner, M. (1999): Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110, 94-102.
- Aubele, M., Mattis, A., Zitzelsberger, H., Walch, A., Kremer, M., Welzl, G., Hofler, H., & Werner, M. (2000 a): Extensive ductal carcinoma in situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer* 85, 82-86.
- Aubele, M., Cummings, M., Walsch, A., Zitzelsberger, H., Nahrig, J., Hofler, H., & Werner, M. (2000 b): Heterogeneous chromosomal aberrations in intraductal breast lesions adjacent to invasive carcinoma. *Anal Cell Pathol* 20, 17-24.
- Aubele, M., Werner, M., & Hofler, H. (2002): Genetic alterations in presumptive precursor lesions of breast carcinomas. *Anal Cell Pathol* 24, 69-76.
- Auer, G. U., Caspersson, T. O., & Wallgren, A. S. (1980): DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 2, 161-165.
- Auer, G., Eriksson, E., Azavedo, E., Caspersson, T., & Wallgren, A. (1984): Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res* 44, 394-396.
- Bässler, R., Böcker, W., & Hermanek, P. (1992): Die gegenwärtige Situation des Gradings beim Mammakarzinom. *Pathologe* 13, 130-134.
- Baudis, M. 2000. Progenetix - cytogenetic abnormalities in human cancer. [www.progenetix.net](http://www.progenetix.net)
- Baudis, M, and ML Cleary. 2001. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 12, no. 17: 1228-1229.
- Beral, V. (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427.
- Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2004): NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10137-10142.
- Blackwood, M. A., & Weber, B. L. (1998): BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Oncol* 16, 1969-1977.

- Bloom, H. J., & Richardson, W. W. (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11, 359-377.
- Boecker, W., Buerger, H., Schmitz, K., Ellis, I. A., van Diest, P. J., Sinn, H. P., Geradts, J., Diallo, R., Poremba, C., & Herbst, H. (2001): Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol* 195, 415-421.
- Böcking, A., Chatelain, R., Biesterfeld, S., Noll, E., Biesterfeld, D., Wohltmann, D., & Goecke, C. (1989): DNA grading of malignancy in breast cancer. Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Anal Quant Cytol Histol* 11, 73-80.
- Borgen, E., Beiske, K., Trachsel, S., Nesland, J. M., Kvalheim, G., Herstad, T. K., Schlichting, E., Qvist, H., & Naume, B. (1998): Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 185, 427-434.
- Borgen, E., Naume, B., Nesland, J. M., Kvalheim, G., Beiske, K., Fodstad, O., Slash, D., Solomayer, E. F., Theocharous, P., *et al.* (1999): Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1, 377-388.
- Buerger, H., Otterbach, F., Simon, R., Schafer, K. L., Poremba, C., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Dockhorn-Dworniczak, B., & Boecker, W. (1999): Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 189, 521-526.
- Buerger, H., Mommers, E. C., Littmann, R., Diallo, R., Brinkschmidt, C., Poremba, C., Dockhorn-Dworniczak, B., van Diest, P. J., & Bocker, W. (2000): Correlation of morphologic and cytogenetic parameters of genetic instability with chromosomal alterations in in situ carcinomas of the breast. *Am J Clin Pathol* 114, 854-859.
- Buerger, H., Schmidt, H., Beckmann, A., Zanker, K. S., Boecker, W., & Brandt, B. (2001): Genetic characterisation of invasive breast cancer: a comparison of CGH and PCR based multiplex microsatellite analysis. *J Clin Pathol* 54, 836-840.
- Burki, N. G., Caduff, R., Walt, H., Moll, C., Pejovic, T., Haller, U., & Ward, D. C. (2000): Comparative genomic hybridization of fine needle aspirates from breast carcinomas. *Int J Cancer* 88, 607-613.
- Cao, Y., Paner, G. P., Kahn, L. B., & Rajan, P. B. (2004): Noninvasive carcinoma of the breast: angiogenesis and cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med* 128, 893-896.
- Cardoso, J., Molenaar, L., de Menezes, R. X., Rosenberg, C., Morreau, H., Moslein, G., Fodde, R., & Boer, J. M. (2004): Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 32, e146.
- Chen, W., Erdogan, F., Ropers, H. H., Lenzner, S., & Ullmann, R. (2005): CGHPRO - A comprehensive data analysis tool for array CGH. *BMC Bioinformatics* 6, 85.
- Cingoz, S., Altungoz, O., Canda, T., Saydam, S., Aksakoglu, G., & Sakizli, M. (2003): DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 145, 108-114.
- Cleton-Jansen, A. M., Buerger, H., Haar Nt, N., Philippo, K., Van De Vijver, M. J., Boecker, W., Smit, V. T., & Cornelisse, C. J. (2004): Different mechanisms of chromosome 16 loss of heterozygosity in well- versus poorly differentiated ductal breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41, 109-116.
- Climent, J., Garcia, J. L., Mao, J. H., Arsuaga, J., & Perez-Losada, J. (2007): Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. *Biochem Cell Biol* 85, 497-508.
- Collins, C., Rommens, J. M., Kowbel, D., Godfrey, T., Tanner, M., Hwang, S. I., Polikoff, D., Nonet, G., Cochran, J., Myambo, K., *et al.* (1998): Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8703-8708.

- Courjal, F., & Theillet, C. (1997): Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res* 57, 4368-4377.
- Cremer, T., Landegent, J., Bruckner, A., Scholl, H. P., Schardin, M., Hager, H. D., Devilee, P., Pearson, P., & van der Ploeg, M. (1986): Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 74, 346-352.
- Cuadros, M., & Villegas, R. (2009): Systematic review of HER2 breast cancer testing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17, 1-7.
- Daly, M. B. (2006): Tamoxifen in ductal carcinoma in situ. *Semin Oncol* 33, 647-649.
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., & Lasken, R. S. (2001): Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11, 1095-1099.
- Devries, S., Nyante, S., Korkola, J., Segraves, R., Nakao, K., Moore, D., Bae, H., Wilhelm, M., Hwang, S., & Waldman, F. (2005): Array-based comparative genomic hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. *J Mol Diagn* 7, 65-71.
- du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P., & Cremer, T. (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610.
- Egervari, K., Szollosi, Z., & Nemes, Z. (2008): Immunohistochemical antibodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Tumour Biol* 29, 18-27.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410.
- Engel, J., Hölzel, D., & Schubert-Fritschle, G. (2005): Epidemiologie. In: Manual Mammakarzinome. Tumorzentrum München, 10. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 1-12.
- Fehm, T., Morrison, L., Saboorian, H., Hynan, L., Tucker, T., & Uhr, J. (2002): Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat* 75, 227-239.
- Feulgen, R., & Rosenbeck, H. (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seylers Z physiol Chem* 135, 203-248.
- Forozan, F., Mahlamaki, E. H., Monni, O., Chen, Y., Veldman, R., Jiang, Y., Gooden, G. C., Ethier, S. P., Kallioniemi, A., & Kallioniemi, O. P. (2000): Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 60, 4519-4525.
- Fridlyand, J., Snijders, A. M., Ylstra, B., Li, H., Olshen, A., Segraves, R., Dairkee, S., Tokuyasu, T., Ljung, B. M., Jain, A. N., et al. (2006): Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6, 96.
- Fuhrmann, C., Schmidt-Kittler, O., Stoecklein, N. H., Petat-Dutter, K., Vay, C., Bockler, K., Reinhardt, R., Ragg, T., & Klein, C. A. (2008): High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Res* 36, e39.
- Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Beck, E. P., Lang, N., & Jager, W. (2001): Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 19, 3669-3674.
- Ghadimi, B. M., Uhr, J., Tucker, T., Heselmeyer-Haddad, K., Auer, G., Ried, T., & Becker, H. (2001): [Interphase cytogenetics with DNA-probes for chromosome 8 to detect circulating tumor cells in breast cancer patients]. *Zentralbl Chir* 126, 922-925.

- Ghazani, A. A., Arneson, N. C., Warren, K., & Done, S. J. (2006): Limited tissue fixation times and whole genomic amplification do not impact array CGH profiles. *J Clin Pathol* 59, 311-315.
- Gong, G., DeVries, S., Chew, K. L., Cha, I., Ljung, B. M., & Waldman, F. M. (2001): Genetic changes in paired atypical and usual ductal hyperplasia of the breast by comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 7, 2410-2414.
- Gough, S. M., McDonald, M., Chen, X. N., Korenberg, J. R., Neri, A., Kahn, T., Eccles, M. R., & Morris, C. M. (2003): Refined physical map of the human PAX2/HOX11/NFKB2 cancer gene region at 10q24 and relocalization of the HPV6A11 viral integration site to 14q13.3-q21.1. *BMC Genomics* 4, 9.
- Gunther, K., Merkelbach-Bruse, S., Amo-Takyi, B. K., Handt, S., Schroder, W., & Tietze, L. (2001): Differences in genetic alterations between primary lobular and ductal breast cancers detected by comparative genomic hybridization. *J Pathol* 193, 40-47.
- Häring, R., & Zilch, H. (1997): *Chirurgie. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 4 Aufl.*
- Haroske, G., Baak, J. P., Danielsen, H., Giroud, F., Gschwendtner, A., Oberholzer, M., Reith, A., Spieler, P., & Bocking, A. (2001): Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 23, 89-95.
- Heselmeyer, K., Schrock, E., du Manoir, S., Blegen, H., Shah, K., Steinbeck, R., Auer, G., & Ried, T. (1996): Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 479-484.
- Heselmeyer-Haddad, K., Chaudhri, N., Stoltzfus, P., Cheng, J. C., Wilber, K., Morrison, L., Auer, G., & Ried, T. (2002): Detection of chromosomal aneuploidies and gene copy number changes in fine needle aspirates is a specific, sensitive, and objective genetic test for the diagnosis of breast cancer. *Cancer Res* 62, 2365-2369.
- Heselmeyer-Haddad, K., Janz, V., Castle, P. E., Chaudhri, N., White, N., Wilber, K., Morrison, L. E., Auer, G., Burroughs, F. H., Sherman, M. E., & Ried, T. (2003): Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am J Pathol* 163, 1405-1416.
- Hiller, B., Bradtke, J., Balz, H., & Rieder, H. (2005): CyDAS: a cytogenetic data analysis system. *Bioinformatics* 21, 1282-1283.
- Hoque, A., Menter, D. G., Sahin, A. A., Sneige, N., & Lippman, S. M. (2001): No increased Ki67 expression in ductal carcinoma in situ associated with invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 153-154.
- Husemann, Y., & Klein, C. A. (2009): The analysis of metastasis in transgenic mouse models. *Transgenic Res* 18, 1-5.
- Ioannidis, P., Mahaira, L., Papadopoulou, A., Teixeira, M. R., Heim, S., Andersen, J. A., Evangelou, E., Dafni, U., Pandis, N., & Tringali, T. (2003): 8q24 Copy number gains and expression of the c-myc mRNA stabilizing protein CRD-BP in primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 104, 54-59.
- Ishkanian, A. S., Malloff, C. A., Watson, S. K., DeLeeuw, R. J., Chi, B., Coe, B. P., Snijders, A., Albertson, D. G., Pinkel, D., Marra, M. A., *et al.* (2004): A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36, 299-303.
- James, L. A., Mitchell, E. L., Menasce, L., & Varley, J. M. (1997): Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast: identification of regions of DNA amplification and deletion in common with invasive breast carcinoma. *Oncogene* 14, 1059-1065.
- Jansen, R. L., Hillen, H. F., & Schouten, H. C. (1997): Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Neth J Med* 51, 65-77.
- Johnson, N. A., Hamoudi, R. A., Ichimura, K., Liu, L., Pearson, D. M., Collins, V. P., & Du, M. Q. (2006): Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 86, 968-978.

- Jones, C., Nonni, A. V., Fulford, L., Merrett, S., Chaggar, R., Eusebi, V., & Lakhani, S. R. (2001): CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. *Br J Cancer* 85, 422-427.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., & Pinkel, D. (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-243.
- King, B. L., Tsai, S. C., Gryga, M. E., D'Aquila, T. G., Seelig, S. A., Morrison, L. E., Jacobson, K. K., Legator, M. S., Ward, D. C., Rimm, D. L., & Phillips, R. F. (2003): Detection of chromosomal instability in paired breast surgery and ductal lavage specimens by interphase fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 9, 1509-1516.
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R., & Riethmuller, G. (1999): Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4494-4499.
- Klein, C. A. (2008): The direct molecular analysis of metastatic precursor cells in breast cancer: a chance for a better understanding of metastasis and for personalised medicine. *Eur J Cancer* 44, 2721-2725.
- Komoike, Y., Motomura, K., Inaji, H., & Koyama, H. (2000): Diagnosis of ductal carcinoma in situ (DCIS) and intraductal papilloma using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. *Breast Cancer* 7, 332-336.
- Kuukasjarvi, T., Tanner, M., Pennanen, S., Karhu, R., Kallioniemi, O. P., & Isola, J. (1997): Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 150, 1465-1471.
- Kwek, S. S., Roy, R., Zhou, H., Climent, J., Martinez-Climent, J. A., Fridlyand, J., & Albertson, D. G. (2009): Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* 28, 1892-1903.
- Laganier, J., Deblois, G., Lefebvre, C., Bataille, A. R., Robert, F., & Giguere, V. (2005): From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11651-11656.
- Lagios, M. D. (1990): Duct carcinoma in situ. Pathology and treatment. *Surg Clin North Am* 70, 853-871.
- Lakhani, S. R., Collins, N., Stratton, M. R., & Sloane, J. P. (1995): Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *J Clin Pathol* 48, 611-615.
- Lakhani, S. R., Slack, D. N., Hamoudi, R. A., Collins, N., Stratton, M. R., & Sloane, J. P. (1996): Detection of allelic imbalance indicates that a proportion of mammary hyperplasia of usual type are clonal, neoplastic proliferations. *Lab Invest* 74, 129-135.
- Langer, P. R., Waldrop, A. A., & Ward, D. C. (1981): Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6633-6637.
- Larson, P. S., de las Morenas, A., Bennett, S. R., Cupples, L. A., & Rosenberg, C. L. (2002): Loss of heterozygosity or allele imbalance in histologically normal breast epithelium is distinct from loss of heterozygosity or allele imbalance in co-existing carcinomas. *Am J Pathol* 161, 283-290.
- Latta, E. K., Tjan, S., Parkes, R. K., & O'Malley, F. P. (2002): The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 15, 1318-1325.
- Lebeau, A., Unholzer, A., Amann, G., Kronawitter, M., Bauerfeind, I., Sendelhofert, A., Iff, A., & Lohrs, U. (2003): EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 79, 187-198.

- Lebeau, A., Högel, B., Nährling, J., & Permanetter, W. (2005): Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In: Manual Mammakarzinome. Tumorzentrum München, 10. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 48-72.
- Legrand, B., Mazancourt, P., Durigon, M., Khalifat, V., & Crainic, K. (2002): DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int* 125, 205-211.
- Letessier, A., Sircoulomb, F., Ginestier, C., Cervera, N., Monville, F., Gelsi-Boyer, V., Esterni, B., Geneix, J., Finetti, P., Zemmour, C., *et al.* (2006): Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers. *BMC Cancer* 6, 245.
- Li, C. I., Malone, K. E., Saltzman, B. S., & Daling, J. R. (2006): Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001. *Cancer* 106, 2104-2112.
- Li, J., Wang, K., Li, S., Timmermans-Wielenga, V., Rank, F., Wiuf, C., Zhang, X., Yang, H., & Bolund, L. (2009): DNA copy number aberrations in breast cancer by array comparative genomic hybridization. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 7, 13-24.
- Lin, L., Miller, C. T., Contreras, J. I., Prescott, M. S., Dagenais, S. L., Wu, R., Yee, J., Orringer, M. B., Misek, D. E., Hanash, S. M., *et al.* (2002): The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 62, 5273-5279.
- Little, S. E., Vuononvirta, R., Reis-Filho, J. S., Natrajan, R., Iravani, M., Fenwick, K., Mackay, A., Ashworth, A., Pritchard-Jones, K., & Jones, C. (2005): Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. *Genomics*.
- Liva, S., Hupe, P., Neuvial, P., Brito, I., Viara, E., La Rosa, P., & Barillot, E. (2006): CAPweb: a bioinformatics CGH array Analysis Platform. *Nucleic Acids Res* 34, W477-481.
- Lizardi, P. M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. C., & Ward, D. C. (1998): Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 19, 225-232.
- Loveday, R. L., Greenman, J., Simcox, D. L., Speirs, V., Drew, P. J., Monson, J. R., & Kerin, M. J. (2000): Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer* 86, 494-500.
- Lu, Y. J., Osin, P., Lakhani, S. R., Di Palma, S., Gusterson, B. A., & Shipley, J. M. (1998): Comparative genomic hybridization analysis of lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia and potential roles for gains and losses of genetic material in breast neoplasia. *Cancer Res* 58, 4721-4727.
- Mastracci, T. L., Shadeo, A., Colby, S. M., Tuck, A. B., O'Malley, F. P., Bull, S. B., Lam, W. L., & Andrullis, I. L. (2006): Genomic alterations in lobular neoplasia: a microarray comparative genomic hybridization signature for early neoplastic proliferation in the breast. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 1007-1017.
- Menten, B., Pattyn, F., De Preter, K., Robbrecht, P., Michels, E., Buysse, K., Mortier, G., De Paepe, A., van Vooren, S., Vermeesch, J., *et al.* (2005): arrayCGHbase: an analysis platform for comparative genomic hybridization microarrays. *BMC Bioinformatics* 6, 124.
- Meteoglu, I., Dikicioglu, E., Erkus, M., Culhaci, N., Kacar, F., Ozkara, E., & Uyar, M. (2005): Breast carcinogenesis. Transition from hyperplasia to invasive lesions. *Saudi Med J* 26, 1889-1896.
- Meuret, G. (1995): Mammakarzinom: Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York.
- Mitelman, F. (1995): ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger, Basel.
- Mommers, E. C., Poulin, N., Sangulin, J., Meijer, C. J., Baak, J. P., & van Diest, P. J. (2001): Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis. *J Pathol* 193, 33-39.

- Montagut, C., Tusquets, I., Ferrer, B., Corominas, J. M., Bellosillo, B., Campas, C., Suarez, M., Fabregat, X., Campo, E., Gascon, P., *et al.* (2006): Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 13, 607-616.
- Morandi, L., Marucci, G., Foschini, M. P., Cattani, M. G., Pession, A., Riva, C., & Eusebi, V. (2006): Genetic similarities and differences between lobular in situ neoplasia (LN) and invasive lobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 449, 14-23.
- Moulis, S., & Sgroi, D. C. (2008): Re-evaluating early breast neoplasia. *Breast Cancer Res* 10, 302.
- Muratovska, A., Zhou, C., He, S., Goodyer, P., & Eccles, M. R. (2003): Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* 22, 7989-7997.
- Naylor, T. L., Greshock, J., Wang, Y., Colligon, T., Yu, Q. C., Clemmer, V., Zaks, T. Z., & Weber, B. L. (2005): High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast Cancer Res* 7, R1186-1198.
- Nessling, M., Richter, K., Schwaenen, C., Roerig, P., Wrobel, G., Wessendorf, S., Fritz, B., Bentz, M., Sinn, H. P., Radwimmer, B., & Lichter, P. (2005): Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res* 65, 439-447.
- Nishizaki, T., Chew, K., Chu, L., Isola, J., Kallioniemi, A., Weidner, N., & Waldman, F. M. (1997): Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 74, 513-517.
- Nyante, S. J., Devries, S., Chen, Y. Y., & Hwang, E. S. (2004): Array-based comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ and synchronous invasive lobular cancer. *Hum Pathol* 35, 759-763.
- Orstavik, K. H. (2006): Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases. *Acta Paediatr Suppl* 95, 24-29.
- Ottesen, G. L. (2003): Carcinoma in situ of the female breast. A clinico-pathological, immunohistological, and DNA ploidy study. *APMIS Suppl*, 1-67.
- Pageau, G. J., Hall, L. L., Ganesan, S., Livingston, D. M., & Lawrence, J. B. (2007): The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers. *Nat Rev Cancer* 7, 628-633.
- Pantel, K., Cote, R. J., & Fodstad, O. (1999): Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91, 1113-1124.
- Pardue, M. L., & Gall, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600-604.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., *et al.* (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.
- Petersen, I., Schwendel, A., Bockmuhl, U., & Dietel, M. (1996): [Comparative genomic hybridization. A screening method in genetic tumor diagnosis]. *Pathologe* 17, 333-341.
- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2934-2938.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., & Gray, J. (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9138-9142.
- Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Waldman, F. M., Gray, J. W., & Pinkel, D. (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 10-26.
- Putti, T. C., El-Rehim, D. M., Rakha, E. A., Paish, C. E., Lee, A. H., Pinder, S. E., & Ellis, I. O. (2005): Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol* 18, 26-35.

- Reichenberger, K. J., Coletta, R. D., Schulte, A. P., Varella-Garcia, M., & Ford, H. L. (2005): Gene amplification is a mechanism of Six1 overexpression in breast cancer. *Cancer Res* 65, 2668-2675.
- Reis-Filho, J. S., & Lakhani, S. R. (2003): The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res* 5, 313-319.
- Reis-Filho, J. S., Simpson, P. T., Jones, C., Steele, D., Mackay, A., Iravani, M., Fenwick, K., Valgeirsson, H., Lambros, M., Ashworth, A., *et al.* (2005): Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: role of comprehensive molecular pathology in characterization of an entity. *J Pathol*.
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987): [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8, 138-140.
- Remmele, W. (1997): Pathologie. *Band 4, 2. Auflage, Springer, Berlin.*
- Richard, F., Pacyna-Gengelbach, M., Schljuns, K., Fleige, B., Winzer, K. J., Szymas, J., Dietel, M., Petersen, I., & Schwendel, A. (2000): Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 89, 305-310.
- Ried, T., Just, K. E., Holtgreve-Grez, H., du Manoir, S., Speicher, M. R., Schrock, E., Latham, C., Blegen, H., Zetterberg, A., Cremer, T., & *et al.* (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55, 5415-5423.
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C., & Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-251.
- Roggel, F., Hocke, S., Lindemann, K., Sinz, S., Welk, A., Bosl, M., Pabst, M., Nusser, N., Braun, S., Schmitt, M., & Harbeck, N. (2003): Minimal residual disease in breast cancer and gynecological malignancies: phenotype and clinical relevance. *Recent Results Cancer Res* 162, 89-100.
- Roses, R. E., Paulson, E. C., Sharma, A., Schueller, J. E., Nisenbaum, H., Weinstein, S., Fox, K. R., Zhang, P. J., & Czerniecki, B. J. (2009): HER-2/neu overexpression as a predictor for the transition from in situ to invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 1386-1389.
- Ross, J. S., & Fletcher, J. A. (1999): HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112, S53-67.
- Ross, J. S., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Leschly, N., Symmans, W. F., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2004): Breast cancer biomarkers and molecular medicine: part II. *Expert Rev Mol Diagn* 4, 169-188.
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., *et al.* (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288, 321-333.
- Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A., & Sheer, D. (1999): Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59, 1433-1436.
- Roylance, R., Gorman, P., Hanby, A., & Tomlinson, I. (2002): Allelic imbalance analysis of chromosome 16q shows that grade I and grade III invasive ductal breast cancers follow different genetic pathways. *J Pathol* 196, 32-36.
- Roylance, R., Droufakou, S., Gorman, P., Gillett, C., Hart, I. R., Hanby, A., & Tomlinson, I. (2003): The role of E-cadherin in low-grade ductal breast tumourigenesis. *J Pathol* 200, 53-58.
- Sanders, M. E., Schuyler, P. A., Dupont, W. D., & Page, D. L. (2005): The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer* 103, 2481-2484.

- Sauter, G., Lee, J., Bartlett, J. M., Slamon, D. J., & Press, M. F. (2009): Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27, 1323-1333.
- Scheithauer, J. (2001): Chromosomale Imbalancen bei Mammakarzinomen in Korrelation zu der bildzytometrisch bestimmten DNA-Ploidie und zu weiteren klinikopathologischen Markern. Nachweis mittels Komparativer Genomischer Hybridisierung - CGH. TU Dresden, Dissertation, 1-100.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T. J., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., *et al.* (2003): From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7737-7742.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., *et al.* (2004): Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525-528.
- Shadeo, A., & Lam, W. L. (2006): Comprehensive copy number profiles of breast cancer cell model genomes. *Breast Cancer Res* 8, R9.
- Shelley Hwang, E., Nyante, S. J., Yi Chen, Y., Moore, D., DeVries, S., Korkola, J. E., Esserman, L. J., & Waldman, F. M. (2004): Clonality of lobular carcinoma in situ and synchronous invasive lobular carcinoma. *Cancer* 100, 2562-2572.
- Silverstein, M. J., Poller, D. N., Waisman, J. R., Colburn, W. J., Barth, A., Gierson, E. D., Lewinsky, B., Gamagami, P., & Slamon, D. J. (1995): Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 345, 1154-1157.
- Silverstein, M. (1997): Ductal carcinoma in situ of the breast. *Williams & Wilkins, Baltimore*.
- Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., & Lakhani, S. R. (2005): Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205, 248-254.
- Snijders, A. M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A. K., Huey, B., Kimura, K., *et al.* (2001): Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29, 263-264.
- Sobin, L., & Wittekind, C. (2002): UICC TNM classification of malignant tumours. 6. Auflage, *Wiley-Liss, New York*, 131-141.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., & Lichter, P. (1997): Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 399-407.
- Steinbeck, R. G., & Auer, G. U. (2000): Genome instability in human tumorigenesis: microphotometry of interphase nuclei and pathologic mitoses reveals dysplasia. *Eur J Histochem* 44, 133-142.
- Stoecklein, N. H., Erbersdobler, A., Schmidt-Kittler, O., Diebold, J., Schardt, J. A., Izbicki, J. R., & Klein, C. A. (2002): SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol* 161, 43-51.
- Strachan, T., & Read, A. P. (1996): Molekulare Humangenetik. *Spektrum, Heidelberg*.
- Sturn, A., Quackenbush, J., & Trajanoski, Z. (2002): Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18, 207-208.
- Tanner, M. M., Karhu, R. A., Nupponen, N. N., Borg, A., Baldetorp, B., Pejovic, T., Ferno, M., Killander, D., & Isola, J. J. (1998): Genetic aberrations in hypodiploid breast cancer: frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. *Am J Pathol* 153, 191-199.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., & Tunnacliffe, A. (1992): Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, 718-725.

- Thor, A. D., Eng, C., DeVries, S., Paterakos, M., Watkin, W. G., Edgerton, S., Moore, D. H., 2nd, Ezzell, J., & Waldman, F. M. (2002): Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol* 33, 628-631.
- Tsubosa, Y., Sugihara, H., Mukaisho, K., Kamitani, S., Peng, D. F., Ling, Z. Q., Tani, T., & Hattori, T. (2005): Effects of degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 158, 156-166.
- Tyczynski, J., Bray, F., & Parkin, D. (2002): Breast cancer in Europe. *European Network of Cancer Registries ENCR* 2, 1-4.
- Untch, M., de Waal, J., Dimpfl, T., Eiermann, W., Engel, J., Gabka, J., Höß, C., Janni, W., Kahlert, S., von Koch, F., *et al.* (2005): Klinik der In-situ-Karzinome. In: Manual Mammakarzinome. Tumorzentrum München, 10. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 73-79.
- van Beers, E. H., & Nederlof, P. M. (2006): Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Res* 8, 210.
- Vincent-Salomon, A., Lucchesi, C., Gruel, N., Raynal, V., Pierron, G., Goudefroye, R., Reyal, F., Radvanyi, F., Salmon, R., Thiery, J. P., *et al.* (2008): Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 14, 1956-1965.
- Visscher, D. W., Wallis, T. L., & Crissman, J. D. (1996): Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. *Cancer* 77, 315-320.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., & Bos, J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1994): Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature* 370, 174-175.
- Vos, C. B., Ter Haar, N. T., Peterse, J. L., Cornelisse, C. J., & van de Vijver, M. J. (1999): Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 187, 279-284.
- Vos, C. B., ter Haar, N. T., Rosenberg, C., Peterse, J. L., Cleton-Jansen, A. M., Cornelisse, C. J., & van de Vijver, M. J. (1999): Genetic alterations on chromosome 16 and 17 are important features of ductal carcinoma in situ of the breast and are associated with histologic type. *Br J Cancer* 81, 1410-1418.
- Waldman, F. M., DeVries, S., Chew, K. L., Moore, D. H., 2nd, Kerlikowske, K., & Ljung, B. M. (2000): Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. *J Natl Cancer Inst* 92, 313-320.
- Waldman, F. M., Hwang, E. S., Ezzell, J., Eng, C., DeVries, S., Bennington, J., & Thor, A. (2001): Genomic alterations in tubular breast carcinomas. *Hum Pathol* 32, 222-226.
- Wang, G., Maher, E., Brennan, C., Chin, L., Leo, C., Kaur, M., Zhu, P., Rook, M., Wolfe, J. L., & Makrigiorgos, G. M. (2004): DNA amplification method tolerant to sample degradation. *Genome Res* 14, 2357-2366.
- Wang, P., Kim, Y., Pollack, J., Narasimhan, B., & Tibshirani, R. (2005): A method for calling gains and losses in array CGH data. *Biostatistics* 6, 45-58.
- Weng, L. P., Brown, J. L., & Eng, C. (2001): PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 10, 599-604.
- Xie, D., Jauch, A., Miller, C. W., Bartram, C. R., & Koeffler, H. P. (2002): Discovery of over-expressed genes and genetic alterations in breast cancer cells using a combination of suppression subtractive hybridization, multiplex FISH and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 21, 499-507.

- Yao, J., Weremowicz, S., Feng, B., Gentleman, R. C., Marks, J. R., Gelman, R., Brennan, C., & Polyak, K. (2006): Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res* 66, 4065-4078.
- Yasui, K., Imoto, I., Fukuda, Y., Pimkhaokham, A., Yang, Z. Q., Naruto, T., Shimada, Y., Nakamura, Y., & Inazawa, J. (2001): Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 32, 112-118.
- Yildirim-Assaf, S., Coumbos, A., Hopfenmuller, W., Foss, H. D., Stein, H., & Kuhn, W. (2007): The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. *J Clin Pathol* 60, 649-655.
- Zielinski, B., Gratiás, S., Toedt, G., Mendrzyk, F., Stange, D. E., Radlwimmer, B., Lohmann, D. R., & Lichter, P. (2005): Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 43, 294-301.
- Zhong, X. B., Lizardi, P. M., Huang, X. H., Bray-Ward, P. L., & Ward, D. C. (2001): Visualization of oligonucleotide probes and point mutations in interphase nuclei and DNA fibers using rolling circle DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3940-3945.
- Zhou, C. J., Zhang, Q. H., Zhang, T. G., Sun, S. Z., Li, H., Wang, Y., & Liu, Z. Y. (2009): Expression of ER, Ki-67 and cyclinD1 in the pre-cancerous breast of Chinese patients. *Pathol Oncol Res* 15, 153-158.

## 8 Publikationen

### Eigene Veröffentlichungen

Montag, U., Schröck, E., Matthäi, A., Steinhoff, S., Steinbeck, R., Castaños-Vélez, E., Klein, C. & Niemitz C. (2006): Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) - Methodische Aspekte und Anwendungen. In: Niemitz, C. (Hrsg.): *Mitteilungen der Berliner Gesellschaft für Anthropologie, Ethnologie und Urgeschichte*, Beiheft 1, 61-67. Berlin: Verlag Marie Leidorf GmbH.

Pawan Pyakurel, Ulrike Montag, Esmeralda Castaños-Vélez, Ephata Kaaya, Birger Christensson, Holger Tonnies, Peter Biberfeld, & Thomas Heiden. (2006): CGH of microdissected Kaposi's sarcoma lesions reveals recurrent loss of chromosome Y in early and additional chromosomal changes in late tumour stages. *Aids* 20, 1805-1812.

### Posterpräsentationen

Ulrike Montag, Esmeralda Castaños-Veléz, Sabine Steinhoff, Fabienne Trotier, Uwe Köster, Simone Spieckermann, Christoph Klein, Rüdiger Steinbeck & Evelin Schröck (2003): Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis of microdissected early breast cancer lesions. *Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik*, Marburg

Ulrike Montag, Esmeralda Castaños-Veléz, Sabine Steinhoff, Anja Matthäi, Katrin Friedrich, Gustavo Baretton, Christoph Klein, Rüdiger Steinbeck & Evelin Schröck (2004): Array-CGH and conventional CGH-analysis of laser-microdissected early breast cancer lesions DCIS, LCIS and ADH. (2004). *Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Humangenetik*, München

Ulrike Montag, Uta Strassburger, Sabine Steinhoff, Katrin Friedrich, Esmeralda Castaños-Veléz, Oleg Schmidt-Kittler, Gustavo Baretton, Rüdiger Steinbeck, Evelin Schröck, Christoph Klein & Anja Matthäi (2005): Array CGH of laser-microdissected epithelia from formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) breast and prostate tissues. *Array-CGH and Molecular Cytogenetics Conference*, Bari, Italien

Thomas Heiden, Ulrike Montag, Pawan Pyakurel, Ephata Kaaya, Peter Biberfeld, Evelin Schröck, Esmeralda Castaños-Vélez (2005): CGH analysis of microdissected early and late stage Kaposi's sarcoma (KS) - comparison with published cytogenetic data. Cambridge Healthtech Institute, *5th annual conference "Getting Optimised Targets"*, Boston MA, USA

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

5c-ER	5c-Exceeding-Rate (mehr als 5-facher DNA-Gehalt eines haploiden Chromosomensatzes)
ADH	Atypisch duktale Hyperplasie
ALH	Atypisch lobuläre Hyperplasie
amp	Amplifikation
BAC	Bacterial artificial chromosome
Bio	mit Biotin markiertes dUTP
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	charged coupled device (hochsensitive digitale Kamera)
cen	Zentromer
CEP	Centromere enumeration probe
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
Chr.	Chromosom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DIG	mit Digoxigenin markiertes dUTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
dim	diminished
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOP-PCR	Degenerate-Oligonucleotide-Primed-Polymerase-Chain-Reaction
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deosxyuridintriphosphat (enthält dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
enh	enhanced
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
NT	Nick Translation
FFPE	In Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, grüner Fluoreszenzfarbstoff
G1, G2 bzw. G3	Histologische Stadieneinteilung (Grading): G1 = gut differenziert, G2 = mässig differenziert, G3 = undifferenziert

H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Salzsäure
IDC	Invasiv-duktales Karzinom
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasiv-lobuläres Karzinom
IRS	IRS Immunoreaktiver Score
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria-Bertani Broth-Medium
LCIS	Lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
LCM	Laser-Mikrodissektion (Laser Capture Microdissection)
LOH	Verlust der Heterozygotie ( <i>loss of heterozygosity</i> )
M	molar (mol/l)
Mb	Megabase
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Na	Natrium
NP-40	Nonidet 40 (Detergenz)
OPA-Puffer	One-Phor-All-Puffer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-Puffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PgR	Progesteronrezeptor
PHA	Phytohemagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Random Priming
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodezylsulfat (Sodiumdodecylsulfate), Detergenz
SG und SO	Spectrum Green und Spectrum Orange
SSC	Saline sodium citrate buffer
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
ter	terminal
TNM-Klassifikation	T = Tumorgroße/-stadium, N = Lymphknotenstatus, M = Metastasierungsgrad
TR	Texas-Rot, roter Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Maß für die Aktivität eines Enzyms (Unit)
XX	weiblich
XY	männlich

## 9.2 Klinische und histopathologische Patientendaten

Nr.	Pat-ID/ Diagnose	Alter	Tumor- größe [cm]	TNM- Klassifikation	Van Nuys- Gruppe	Grading	Nek- rosen	Inva- siv	Rezidiv/ Monate	Ploidie*	ER- IRS*	PR- IRS*	HER2- Score*	Ki-67 [%]*
1	1-IDC	62	0,6	pT1 Nx		2-3		ja	nein		6	6	3	12
2	2-IDC	58	1,5	pT1 Nx		2		ja	nein	4,0	6	4	3	10
3	3-IDC	75	2,2	pT2		2-3		ja	nein	2,0	9	9	3	12
4	4-IDC	77	8,0	pT4 N1		2-3		ja	ja (14)	2,0	6	9	3	20
5	5-ILC	89	3,5	pT2 Nx		2-3		ja		1,9	9	1	3	10
6	6-ILC	65	2,7	pT2 Nx		2-3		ja		2,0	6	9	3	5
7	7-ILC	57	2,3	pT2 Nx		2-3		ja		2,0	0	9	3	20
8	8-ILC	58	2,2	pT2 N1		2-3		ja		4,0	0	0	3	20
9	9-ILC	66	11,0	pT4 Nx		3		ja	ja (44)	2,0	3	3	3	5
10	10-ILC	54	1,5	pT1 Nx		2		ja		2,0	9	9	1	3
11	42-1-DCIS	64	1,4	pTis	3	3	ja		nein	2,0	0	0	0	3
12	42-2-DCIS	64	1,4	pTis	3	3	ja		nein	2,0	0	0	3	15
13	44-ADH	59									6	6	0	0
14	48-DCIS	55	1,4	pTis	2	2	ja		nein		0	0	1	0
15	49-DCIS	55	0,8	pTis	2	2	ja		nein		0	9	0	0
16	51-ADH	45	0,4						nein		6	6	0	0
17	52-DCIS	60	0,4	pT1 N0	3	3	ja	ja	nein	5,1	2	1	3	0
18	54-1-DCIS	64		pTis N0	3	3	ja		nein	3,9	0	0	3	0
19	54-2-DCIS	64		pTis N0	3	3	ja		nein	2,0	0	1	3	15
20	57-IDC	49	3,8	pT2 N2		3		ja	nein		6	9	3	50
21	58-1-DCIS	63	1,8	pTis	3	3	nein	ja		5,5	0	0	3	
22	58-2-ADH	63						ja					0	
23	61-LCIS	32		pT1 Nx				ja	ja (68)	2,3	8	12	3	0
24	63-DCIS	48	4	pT1 N0, pTis	2	2	ja	ja		2,0	12	6	0	0
25	64-IDC	58	1	pT1 N0		1-2		ja		2,0	6	6	0	0
26	65-ADH	52	0,6								1	4	0	0
27	68-LCIS	34	1,0	pT1 N0				ja			0	6	0	5
28	69-LH	53	0,6								0	9	0	0
29	70-LCIS	54		pTis					nein		0	6	3	0
30	71-1-LCIS	48		pTis					ja		1	9	0	0
31	71-2-LCIS	48		pTis					ja		2	9	1	0
32	73-1-LCIS	47		pTis							0	1	0	3
33	73-2-LCIS	47		pTis							0	4	0	0
34	74-1-LCIS	52		pTis					ja (12)		0	0	0	0
35	74-2-LCIS	52		pTis					ja (12)		0	2	0	0
36	77-LCIS	39		pTis					nein		1	8	3	0
37	78-LCIS	65		pTis							0	0	0	0
38	79-1-DCIS	79	2,5	pTis	1	1	nein		nein	2,0	12	9	1	0
39	79-2-DCIS	79	2,5	pTis	1	1	nein		nein	2,0	12	12	2	0
40	81-LCIS	56	0,5	pTis							12	9	1	5
41	82-LCIS	41	0,4	pTis							6	9	2	8
42	83-DCIS	62	3,1	pTis	1	1	nein			2,0	12	12	0	0
43	84-DCIS	55		pTis	1	1	nein		nein		12	0	1	2
44	85-DCIS	55		pTis	2	2	ja		nein	5,2	0	9	3	0
45	86-DCIS	52	0,8	pTis	3	3	ja	ja		3,8	6	3	3	15
46	87-DCIS	70		pTis(m)	1	2	nein		nein		12	12	1	20
47	88-1-DCIS	70	2	pTis	3	3	ja			2,9	0	0	3	1
48	88-2-DCIS	70	2	pTis	3	3	nein			3,5	0		3	0
49	90-DCIS	55	0,5	pTis(2)	3	3	ja			6,4	8	9	1	10
50	91-DCIS	77	1,5	pTis	3	3	ja			3,2	4	3	3	0
51	92-DCIS	69	1,2	pTis	2	2	ja		nein	2,7	12	6	2	0
52	93-DCIS	53	3,3	pTis(2)	3	3	ja		nein	3,0	12	4	3	5
53	94-DCIS	73	1,9	pTis	1	2	nein			2,0	4	12	3	0
54	95-1-DCIS	58	0,9	pTis(2)	3	3	ja			2,0	0	0	3	1
55	95-2-DCIS	58	0,9	pTis(2)	3	3	ja			>4	0	0	3	0
56	97-DCIS	77	1,5	pTis	2	2	ja			2,0		6	2	0
57	98-DCIS	47	0,7	pTis	1	2	nein		nein	2,0	12	3	0	0
58	99-1-DCIS	64	1,5	pTis	1	1	nein	ja		2,0	6	4	3	0
59	99-2-DCIS	64	1,5	pTis	1	1	nein	ja		>4	12	12	2	0
60	101-1-ADH	58		multipel										0
61	101-2-ADH	58		multipel							4	9	3	0
62	103-ADH	64									6	1	1	1
63	104-1-ALH	65									6	0	0	0
64	104-2-ALH	65									9	0	2	0
65	106-ADH	46		multipel							0	6	2	1
66	108-ADH	44		multipel							6	9	2	0
67	109-ALH	66									9	0	2	0
68	110-ADH	70									9	6	0	1
69	112-ADH	50									12	0		0
70	118-LCIS													
71	120-LCIS													
72	131-IDC	64	6,5	pT4 Nx		3		ja			9	6	3	40

(\*) Parameter basieren auf eigenen Untersuchungen an Schnittpräparaten von formalfixiertem Gewebe

### 9.3 Genetische Aberrationen nach konventioneller CGH

lfd.	Pat.-ID	Tumor- typ	Zugewinne	Verluste	Amplifikationen	Deletionen
1	1	IDC	1q; 6pter-q15; 7q11.1-q32; 16p; 17q22-qter; 19q	8p; 11q23-qter; 12p; 16q; 18; Xpter-q24	1q	
2	2	IDC	1q11-32; 6q23-qter; 7p14-pter; 8q; 17q21-qter; 20q	3p11-p21; 4q32-qter; 6q15-q22; 7q22-q31; 8p12-pter; 9p21-pter; 11q14-qter; 13; 16q21-qter; 17p12-pter; Xq22-qter	1q31-q32; 8q21.3-qter; 17q24-qter; 20q12-qter	
3	3	IDC	1q; 3p21-q13.3; 7; 8; 16p	16q	1q	
4	4	IDC	1q; 14; 16p; 20	11q22-qter	1q; 16p	
5	5	ILC	1q; 16p	8p; 11; 13; 16q; 18		
6	6	ILC				
7	7	ILC				
8	8	ILC	1q	6q16-qter; 13q21-qter		
9	9	ILC	9q32-qter; 16p			
10	10	ILC	1q; 7q			
11	42-1	DCIS	6p; 13q; 20; 21	8p21-23		
12	42-2	DCIS	1q24-qter; 2q22-qter; 6p22-q13; 13; 20; 21; X	6q16-qter; 18q12-qter		
13	44	ADH				
14	48	DCIS	8p11.2-qter; 17q; 20p12-pter; 20q11.2-qter	8p12-pter; 13; 11q23-qter; 17p	20q12-qter	8p12-pter; 13q; 17p
15	49	DCIS		10q22-q23; 16q; 17p; 22		16q; 22
16	51	ADH	4p15.1-qter	17pter-q22		
17	52	DCIS	1q; 3p21-pter; 3q23-qter; 5pter-q12; 6p; 8q; 9p21-pter; 12q11-q21; 16p; 17q; 20q	3p14-q13.3; 4p; 6q; 8p; 9q; 12q23-qter; 13q21-qter; 14q24-qter; 17p; 18	1q32-q42; 3p21-p22; 8q22-qter; 17q12; 17q23; 20q12-qter	
18	54-1	DCIS	1q; 4p16; 4q; 6q16-qter; 8q11.1-q23; 12q14-q15; 14q12-q21; 16p12-p13.1; 17q12-21; 21	3p13-pter; 4p11-p15.2; 8p; 9p; 10q22-qter; 11p; 12q21-qter; 14q22-qter; 15; 17p; 18p	14q12-q21; 17q12-q21	
19	54-2	DCIS	1q; 6q16-qter; 14q13-q21; 17q12-21	3p13-3pter; 4p; 5q11.1-q13; 6p12-pter; 8p; 9p; 11p; 12q11-q13; 12q21-qter; 14q22-qter; 15; 17p; 18p; 19q13.2-qter	14q13-q21; 17q12-q21	3p13-pter; 4p; 5p12-pter; 8p; 9p; 12q22-qter; 14q23-qter; 15; 17p; 18p; 19q13.2-qter
20	57	IDC	1p32-p33; 1q; 5; 7; 8; 10p; 16; 17q; 20	1p34.1-pter; 1p11-p31; 4; 9; 17p; 19q	1p32-p33; 1q;	4p
21	58-1	DCIS	1q; 6p22-pter; 17q24-qter	16q; Xq		
22	58-2	ADH		16q; 17p; Xq		
23	58-2-N	normal	6p; 20q	X		
24	61	LCIS	1p22-1p32; 1q; 3q25-qter; 6q21-q25; 14; 15q22-qter; 17q11.1-q23; 19p	11q13-qter; 16q; X		11q14-qter; 16
25	63	DCIS	8p11.2-qter; 16p; 17q25-qter	8p12-8pter; 12p; 16q; 17p; 22q12-qter		
26	64		1q; 16p	16q	1q25-qter	16q
27	65	ADH		Xq11-q21; Xq25-qter		
28	68	LCIS	1q32-qter; 6p21.1-pter	7p12-q11.2		
29	69	LH	1p31-pter; 1q21-q23; 1q32-q41; 2p13-p21; 2q37-qter; 3p14-3p21; 3q25-qter; 6p; 6q23-qter; 9q34-qter; 11p15-pter; 11q13; 11q23; 12p12- pter; 12q13-q14; 12q24.1; 13q14- q21; 14q23-q24; 14q31-qter; 15q21- q24; 17; 19; 20q12-qter; 21q22-qter; 22	3p12; 5p11-p14; 6q11-q21; 12q21; 15q11.1-q14; 18q22-qter; X	1p34.1-p36.1; 3q28-qter; 17q21; 17q24-qter; 21q22-qter; 22q12-qter	Xq

30	70	LCIS	1q	16q		
31	70-N	normal				
32	71-1	LCIS	1q	16q		
33	71-2	LCIS				
34	73-1	LCIS	1q	16q		
35	73-1-N	normal				
36	73-2	LCIS	1; 2p13-p16; 2q; 6p; 7p15-q11.2; 8q23-qter; 12pter-q13; 14q24-qter; 17q11.1-q22; 20	4p; 5p; 6q; 7q21-q31; 8q13-q21.2; 9p; Xp21-q13	1q32-qter; 6p21.3-p22	6q23-qter
37	73-2-N	normal				
38	74-1	LCIS	1q	16q		
39	74-2	LCIS	1q	16q		
40	77	LCIS	1q	16q		
41	77-N	normal				
42	78	LCIS	6p21.1-p22; 8q; 16p	8p12-pter; 16q	8q22-qter; 16p	
43	79-1	DCIS	18	1p36.1-pter		
44	79-2	DCIS		1p36.1-pter; 18p		
45	81	LCIS	1q12-q41	16q; 18p	1q25-q32	16q; 18p
46	81-N	normal				
47	82	LCIS	1q23-q31; 8q; 11q13-14; 12q11-q24.1; 13q12; 15q22-qter; 17q; 19q13.3-qter; 20q12qter	3p11-p14; 6q; 11q21-q23; 13q13-qter; 17p	11q13-q14; 13q12; 19q13.3-qter; 20q12-qter	13q21-qter
48	82-N	normal				
49	83	DCIS	8q21.3-qter	10q23-qter; 16q		
50	84	DCIS	1q23-qter; 2; 3; 8q; 12; 14q11.1-q23; 15q23-qter; 16; 17q21-qter; 18; 20; 21; X	1p11-p22; 8p; 9; 10q21-q23; 17p; 22	14q13-q21; 15q24-qter; 17q22-q25; 20q	
51	84-N	normal				
52	85	DCIS	6pter-q15; 16p; 17p11.2-q21; 17q24-qter; 20; X	3p; 6q16-qter; 9; 18	20q13.1-qter	
53	86	DCIS	5; 6p21.3-pter; 7q; 14q13-q21; 15q25-qter; 17q11.1-q21	1pter-q32; 2; 4; 6q14-qter; 7p; 8p; 12p; 14q22-qter; 17p; 17q21-qter; 20p; 21; 22	14q13-q21; 17q11.1-q21	2q14.1-qter; 8p; 17p; 17q21-qter
54	86-N	normal				
55	87	DCIS		2p21-p23; 6q11-q24		
56	88	DCIS	1q; 2pter-q35; 3q22-qter; 4q25-q31.2; 5p; 6p; 7q; 8q; 17q11.1-q24; 20; 21	4p15.2-q22; 4q33-qter; 5q12-q23; 8p; 9p13-q32; 11q21-qter; 12q13-q21; 13q21-q32; 16q; 18; 19q13.1; X	1q32-q41; 5p; 17q11.1-q21; 17q22-q23	8p; 18p; Xq
57	88-2	DCIS	1q; 3q21-qter; 4q26-q31.1; 5pter-q12; 6p; 7; 8q; 12p; 13; 17q11.1-q25; 19; 20; Xp21-pter	4p14-q21; 4q33-qter; 5q13-q31; 8p; 9q21-q33; 10q23-qter; 11p; 12q13-qter; 18p	1q23-q41; 5pter-q12; 8q12-q21.1; 17q11.1-q21; 17q22-q24; 19q13.4-qter	8p; 18p
58	90	DCIS	1q; 2; 3p14-21; 5p; 6p23-q16; 6q23-qter; 8q; 11p; 12; 17q; 20; X	5q; 8p21-pter; 11q14-qter; 13; 16; 17p11.1-p12	1q; 3p14-p21; 8q21.2-qter; 17q21-qter	11q14-qter; 13; 16q
59	90-N	normal	1q; 3p14-p21; 5p; 6p21.1-pter; 8q; 10p; 10q23-qter; 14q23-qter; 15q21-qter; 16p; 17q; 20	6q11-q22; 8p; 11q14-qter; 13q21-qter	8q21.3-qter; 17q	
60	91	DCIS	1q24-q32; 17q12-q21; 17q23-q24	18	17q12-q21; 17q23-q24	
61	92	DCIS	1q; 2p22-pter; 3q13.3-qter; 10p; 17q	1p35-pter; 1p21-p31; 3p; 4pter-4q28; 7q32-qter; 8p21-pter; 9pter-q21; 10q24-qter; 11q21-qter; 13; 14q24-qter; 17p; Xp11.4-pter		1p21-p31; 4p15.1-q21; 7q32-qter; 9p; 13
62	93	DCIS	1p32-34; 1q24-32; 8p11.2; 17q21	1q43-qter; 3p11-p14; 8p12-pter; 14q24-qter; 17q11.1-q12; 17q22-qter	1p32-34.1; 8p11.2; 17q21	
63	94	DCIS	1	16q	1q	16q
64	95-1	DCIS				

65	95-2	DCIS	1q25-qter; 2pter-q31; 7q31-qter; 8q21.2-qter; 12p; 21	3q21-q26.1; 4p; 5q; 8p; 15; 17p; 18		
66	97	DCIS	1q; 2p; 3q21-qter; 6p21.3-pter; 7q11.1-q31; 8p11.2-qter; 11q13; 15q22-qter; 17q; 19; 20q; 22	1p22-p31; 2q14.1-qter; 9p21-q21; 10q; 11q23-qter; 12q21-qter; 13; 15q11.1-q21; 16q; Xq25-qter	7q31; 8p11.2; 11q13; 15q26; 17q22-q23	
67	98	DCIS	11q13; 14q31-qter; 17q12; 17q22-qter; 20p11.2-p12; 20q12-qter	3p; 11q22-qter; 14q21-q24;	11q13; 17q12; 17q23-qter; 20p11.2-p12; 20q13.2-qter	
68	99-1	DCIS	1q	4q32-q33; 7q21-q32; 11q14-q22; 16q		
69	99-2	DCIS	1q	4q32-q33; 7q21-q32; 16q		
70	101-1	ADH				
71	101-2	ADH				
72	103	ADH				
73	104-1	ALH	20			
74	104-2	ALH				
75	106	ADH	20q; 22			
76	106-N	normal				
77	108	ADH				
78	108-N	normal				
79	109	ALH	1q22-qter	16q		
80	110	ADH				
81	112	ADH		16q		
82	112-N	normal				
83	118	LCIS	1pter-q25; 1q32-q42; 2p13-p21; 2q11.1-q12; 2q24; 2q33-qter; 3p14-p21; 3q26.2-qter; 5q12-q14; 5q31; 6p; 6q24-qter; 7q22-q31; 8q23-q24.1; 9q22-qter; 10; 11q13; 12p12-pter; 12q13-q14; 12q22-q24.1; 13q11-q14; 14; 15q21-qter; 17q; 18q11.2; 20; 21q22-qter; 22	4p15.3-q13; 5p13-pter; 5q33-34; 6q12-q21; 13q21-q33; 16q; 18q12-qter; X	1p12-p13; 1q21-q23; 2q33-qter; 3p14-p21; 3q26.2-qter; 6p21.1-pter; 11q13; 12p12-pter; 12q13-q14; 12q22- q24.1; 14q22-q23; 15q22-q24; 17q; 18q11.2; 20q12; 21q22-qter; 22q12-q13	
84	120	LCIS	1; 6p21.2-pter; 13q13-q14; 14q22-24; 15q22-q23; 17q21	4p15.3-q13; 5p; 5q33-q34; 13q22-qter; 18q; 16q; X		
85	131	IDC	1q; 2pter-q33; 3q24-qter; 4q; 5q11.1-q23; 6q11-q24; 7pter-q31; 8q11.1-q23; 9pter-q32; 10p12-q21; 12p11.2-q22; 14q11.1-q22; 17q11.1-q12; 18q; X	3p21-q23; 4p15.1-pter; 6q25-qter; 8p; 10q25-qter; 11p14-pter; 11q23-qter; 12q24.1-qter; 17p; 19q	1q25-q32; 4q11-q21; 14q11-q21; 17q11.1-q12; 18q22-qter; Xq21-qter	8p12-pter; 10q25-qter; 11q23-qter; 17p

## 9.4 Genetische Aberrationen ausgewählter DCIS - Array-CGH und konventionelle CGH im Vergleich

### 79-2-DCIS-Grad 1

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
1	-1pter-p36.1	-1pter-p36.13	RP11-465B22	RP4-540O3	17.9
6		-6p21.1	RP11-533O20	RP11-121G20	2.2
7		-7q22.1	RP11-114P12	RP5-1059M17	2.1
		+7q31.1-q31.2	RP11-833H9	RP11-80N18	1.3
12		+12p13.1-p12.3	RP11-103D14	RP11-239A17	2.8
		-12q13.11-q13.13	RP3-432E18	RP11-1136G11	5.5
13		-13q34-qter	RP11-17E4	CTB-163C9	3.9
16		-16p12.2-p11.2	Onco5F12 (X07109)	RP11-2C24	6.9
		-16q23.1-qter	RP11-556H2	CTB-121I4	10.9
17		-17q12-q21.31	Onco1G08 (Y00479)	RP11-392O1	6.6
		-17q25.1-qter	RP11-478P5	RP11-567O16	8.4
18	-18p	-18p11.31-q11.2	RP11-106J7	RP11-178F10	16.9
19		-19	CTD-3113P16	GS1-1129C9	63.4
20		-20a13.13	RP11-124D1	Onco4F01 (H15813)	0.3
		-20q13.32-q13.33	RP5-907D15	RP5-1107C24	3.3

### 85-DCIS-Grad 2

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
2		-2p11.2-q11.1	RP11-294I20	RP11-71B7	5.8
3	-3p	-3pter-p25.3	RP11-514J23	RP11-94A14	10.4
		-3p24.2-p13	RP11-421F9	RP11-118O11	45.0
6	+6pter-a15	+6p25.3-a13	RP11-13J16	RP11-256L9	71.9
	-6q16-qter	-6q22.31	RP1-230I3	RP3-329H16	1.0
		-6q25.3	Onco4F06 (M13150)	RP3-366M24	0.3
9	-9	-9	GS1-41L13	RP11-417A4	135.4
11		-11q23.1-q24.2	RP11-107P10	RP11-168K9	14.6
16	+16p	-16q21-qter	RP11-105C20	CTB-121I4	30.4
17	+17p11.2-q21	-17p13.3-p11.2	GS1-68F18	RP11-189D22	18.0
		+17p11.2-q21.2	RP1-162E17	RP11-58O9	19.5
		amp17p11.2	RP1-162E17	RP11-121A13	1.0
		amp17q12-q21.2	RP5-837J1	RP5-1110E20	5.9
		-17q21.2-q23.3	RP11-156E6	RP11-156L14	20.9
	+17q24-qter	+17q23.3-q24.3	RP11-89H15	RP11-387C17	8.8
		-17q25.1-qter	RP11-155C2	RP11-567O16	8.8
18	-18	-18	GS1-74G18	RP11-8P6	136.3
20	+20	-20p11.21-q11.21	RP5-1025A1	RP3-324O17	5.9
		+20q13.13-qter	Onco4F01 (H15813)	CTB-81F12	15.4
	amp20q13.1-qter	amp20q13.2-qter	RP11-10D18	CTB-81F12	12.5
X	+X	+X	RP11-23N11	Onco1E08 (X82434)	152.7

## 86-DCIS-Grad 3

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
1	-1pter-q32	-1pter-1p32.3	RP11-465B22	RP11-116M11	49,8
		-1q22	RP11-307C12	RP11-206M24	2,9
2	-2 del2q14.1-qter	-2	GS1-8L3	RP11-90E11	242,4
3		+3p25.1-p24.3	RP11-255O19	RP11-8D23	2,0
		+3p14.2	RP11-1035L22	RP11-149J4	1,3
4	-4	-4p16.3-p15.31	RP11-2B17	RP11-3J1	17,2
5	+5	+5p14.3-q23.1	RP11-28P24	RP11-11P11	101,5
6	+6p21.3-pter -6q14-qter	+6pter-p22.2	RP11-13J16	RP11-289G11	24,3
		-6p21.2	RP11-174E21	RP11-14G23	2,8
		-6q27	RP1-168I15	RP11-91O16	0,8
7	-7p +7q	-7p	RP4-764O12	RP11-368M16	57,4
		+7q21.11	Onco5A01 (M17219)	RP11-533L22	5,1
		+7q21.13-q21.3	RP11-311I10	RP5-1145A22	6,6
		+7q31.1-q32.2	RP11-5N18	RP11-38P11	21,8
		+7q33-q35	RP11-239G19	RP5-819O4	11,1
8	del8p	del8pter-p12	GS1-77L23	RP11-103O7	35,3
		+8q23.3	RP11-164M9	RP11-67N21	3,1
11		-11q13.1-q13.2	RP11-424O11	RP5-901A4	3,9
12	-12p	-12p13.33-p11.21	RP11-21K20	RP11-460N10	31,5
		-12q24.31-qter	RP11-87C12	RP11-127J8	14,1
14	amp14q13-q21 -14q22-qter	-14q11.1-q12	RP11-98N22	RP11-187E13	11,9
		amp14q12-q13.3	RP11-501E21	RP11-259K15	3,2
		-14q23.3-q24.2	RP11-430G13	RP11-486O13	8,3
15	+15q25-qter	-15q11.2-q13.1	RP11-168G16	RP11-408F10	18,8
		+15q21.1-q21.2	Onco2A04 (L13923)	RP11-313P18	3,1
		+15q26.1-qter	RP11-326A19	CTB-154P1	12,6
16		-16q23.3-qter	RP11-2L4	CTB-121I4	7,4
17	del17 amp17q11.1-q21	-17	CTB-1058E17	RP11-387H17	1,3
		amp17q12-q21.1 amp17q21.2	RP11-89A22	RP5-1110E20	0,2
18		+18q21.2	RP11-751P21	RP11-202D1	0,3
		+18q22.1	RP11-90A21	RP11-23N5	2,6
19		-19	CTD-3113P16	GS1-1129C9	63,4
20	-20p	-20p12.1-p11.23	RP3-348M17	RP11-110C10	1,6
		+20p11.23-q11.21	RP5-1096J16	RP1-234M6	3,4
		+20q11.1	RP11-348I14	RP11-215O6	0,2
21	-21	-21q22.11-q22.13	Onco4H02 (U48250)	RP11-164E1	5,3
22	del22	del22	XX-p8708	CTB-99K24	33,6
X		+Xp21.3-p21.1	RP11-2M5	RP11-172M3	8,4

**87-DCIS-Grad 2**

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
2	-2p21-p23	-2p24.3-p16.3	Onco3D08 (Y00664)	RP11-19A8	33,0
4		+4q13.1	RP11-24I7	RP11-423P14	3,4
6	-6q11-q24	-6q12-q14.3 -6q16.1-q23.3	RP11-277K21 RP11-4D24	RP11-79G3 RP11-95M15	20,9 41,0

**88-2-DCIS-Grad 3**

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
1	+1q amp1q23-q41	+1q	RP3-365I19	RP11-551G24	102,3
3	+3q21-qter	+3q25.1-q26.33	RP11-30J14	RP11-45I24	27,7
4	-4p14-q21 +4q26-q31.1 -4q33-qter	+4q27-q28.1 +4q31.3-q32.3 -4q34.1-qter	RP11-679C8 RP11-259G7 RP11-287F9	RP11-24C13 RP11-25N12 CTC-963K6	7,0 11,9 14,6
5	amp5pter-q12 -5q13-q31	+5p15.2-q11.2	RP11-269G2	RP11-495K20	44,9
7		+7q21.11-q21.12 +7q31.1-q32.2	Onco5A03 RP11-75O20	RP11-212B1 RP11-2E11	7,3 19,5
8	del8p +8q amp8q12-q21.1	-8pter-p11.21 +8q11.23-q24.22 amp8q11.23-q12.1 amp8q12.1-q13.1	RP11-338B22 RP11-53M11 RP11-53M11 RP11-92N3	RP11-231D20 RP11-343P9 RP11-342K10 RP11-21C5	41,6 85,6 2,4 8,5
9	-9q21-q33	-9q21.12-q31.3	RP11-71A24	RP11-1122O23	38,2
10	-10q23-qter	-10q22.2-qter	RP11-40F6	RP11-122K13	53,0
11	-11p	-11pter-p15.2 -11q23.3-q24.2	CTC-908H22 RP11-317A5	RP11-598K3 RP11-106O22	14,7 7,8
12	+12p -12q13-qter	+12p12.3-p11.22 -12q13.11-qter	RP11-473N11 RP3-432E18	RP11-425D17 CTC-221K18	11,9 85,6
13	+13				
17	+17q11.1-q25 amp17q11.1-q21 amp17q22-q24	-17p13.1-p12 +17q11.1-q12 amp17q12-q21.2 -17q21.2-q22 amp17q22-q24.2	RP11-208F13 RP11-260A9 Onco1G08 (Y00479) RP5-971F3 RP11-515O17	RP11-385D13 RP11-215E13 RP5-1112G21 RP11-481C4 RP11-4F22	5,9 7,2 3,3 10,2 11,0
18	del18p	del18p	GS1-74G18	RP11-527H14	14,7
20	+20				
X	+Xp21-pter	+Xp21.3	RP11-106N9	RP11-110F5	1,1

## 98-DCIS-Grad 2

Chr	Konv. CGH	Array-CGH	Start Klon	End Klon	Größe [Kb]
1		+1q31.2-q31.3	RP11-239J11	RP11-75C23	4,3
3	-3p	-3pter-p12.3	RP11-514J23	RP11-11L10	73,9
6		-6q25.3	RP11-88B24	RP11-43B19	1,5
7		+7q32.2	RP11-38P11	RP11-2E11	0,02
11	amp11q13	+11q13.3-q13.5	RP11-542E4	RP11-535A19	5,7
		amp11q21	RP11-685N10	RP11-25P2	2,3
	-11q22-qter	-11q22.3-qter	RP11-27I22	RP11-469N6	26,3
12		-12p13.33-p13.31	RP11-543P15	RP3-467F14	2,9
14	-14q21-q24	-14q21.3-q31.1	RP11-58E21	RP11-406A9	32,7
	+14q31-qter				
16		-16q23.1-qter	RP11-543G23	CTB-121I4	11,4
17	amp17q12	+17q11.2-q12	RP11-474K4	RP11-47L3	3,0
		-17q21.2-q21.32	RP11-506G7	RP11-361K8	5,8
	+17q22-qter amp17q23-qter	+17q22-qter	RP11-429O1	RP11-567O16	30,3
20	amp20p11.2-p12	amp20p12.2-p12.1	RP4-811H13	RP3-348M17	7,4
	+20q12-qter				
	amp20q13.2-qter	amp20q13.2-q13.31	RP4-700G13	RP5-832E24	2,8
		amp20q13.31-q13.33	RP5-1167H4	RP5-1040G13	4,8
		-20q13.33-qter	RP5-1107C24	CTB-81F12	2,5

## **9.5 Kooperationspartner**

Das in dieser Arbeit verwendete Patientenmaterial stammte aus den Archiven des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums in Dresden (Prof. Dr. Gustavo Baretton, Dr. Katrin Friedrich) und dem Labor für Molekularpathologie in Kiel (PD Dr. Rüdiger Steinbeck, Dr. Sabine Steinhoff). Zur Laser-Mikrodissektion der Gewebeproben wurden verschiedene Mikrodissektions-Systeme der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH verwendet (Dr. Esmeralda Heiden). Durch das Institut für Immunologie der Universität München wurden die Methoden der Ligations- und Markierungs-PCR zugänglich (Prof. Dr. Christoph Klein, Dr. Nikolas Stoecklein, Dr. Oleg Schmidt-Kittler). Für die Array-CGH-Analysen wurden gebrauchsfertige Chips, die in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Freien Universität Amsterdam entwickelt wurden, verwendet (Prof. Dr. Gerrit Meijer, Prof. Dr. Bauke Ylstra).

## **9.6 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.