

Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Chromosomale Imbalancen invasiv duktaler und invasiv lobulärer Mammakarzinome detektiert mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH)

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Herrn Frank Richard
aus Freiburg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Dietel
2. Prof. Dr. med. H. Kreipe
3. Prof. Dr. med. W. Böcker

eingereicht: 29.01.1999

Datum der Promotion: 13.12.99

<u>1. EINLEITUNG</u>	4
1.1. DAS MAMMAKARZINOM	4
1.2. KOMPARATIVE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG	6
1.3. BEKANNTE GENETISCHE ALTERATIONEN IN INVASIV DUKTALEN UND INVASIV LOBULÄREN MAMMAKARZINOMEN	7
1.4. FRAGESTELLUNG	9
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	10
2.1. CHEMIKALIEN UND GERÄTE	10
2.2. METHODEN	13
2.2.1. TUMORMATERIAL	14
2.2.2. DNA-EXTRAKTION	15
2.2.3. PRÄPARATION DER METAPHASENCHROMOSOMEN	16
2.2.4. DNA-MARKIERUNG (NICK-TRANSLATION)	17
2.2.5. HYBRIDISIERUNG	17
2.2.6. DNA-NACHWEIS	18
2.2.7. BILDAUFNAHME	19
2.2.8. BILDVERARBEITUNG UND AUSWERTUNG	20
<u>3. ERGEBNISSE</u>	24
3.1. GENETISCHE ALTERATIONEN IN INVASIV DUKTALEN MAMMAKARZINOMEN	24
3.2. GENETISCHE ALTERATIONEN IN INVASIV LOBULÄREN MAMMAKARZINOMEN	25
3.3. VERGLEICH GENETISCHER ALTERATIONEN IN INVASIV DUKTALEN UND INVASIV LOBULÄREN MAMMAKARZINOMEN	26
3.4. GENETISCHE ALTERATIONEN IN GUT UND SCHLECHT DIFFERENZIIERTEN INVASIV DUKTALEN MAMMAKARZINOMEN	31
3.5. VERGLEICH VON ÖSTROGENREZEPTOR-POSITIVEN UND -NEGATIVEN INVASIV DUKTALEN MAMMAKARZINOMEN	32
<u>4. DISKUSSION</u>	34
4.1. INVASIV DUKTALE MAMMAKARZINOME	36
4.1.1. GENETISCHE ALTERATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT DES DIFFERENZIERUNGSGRADES	40
4.1.2. GENETISCHE ALTERATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT DES ÖSTROGENREZEPTOR-STATUS	41
4.2. INVASIV LOBULÄRE MAMMAKARZINOME	42
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	44

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 56

ABBILDUNGEN UND TABELLEN:

<i>Abb. 1:</i> Histologische Beispiele für ein invasiv-duktales und -lobuläres Mammakarzinom	5
<i>Abb. 2:</i> Methodische Schritte der CGH-Analyse	13
<i>Abb. 3:</i> Chromosomenmetaphase im FITC-, TRITC- und DAPI-Bild	19
<i>Abb. 4:</i> CGH-Bildauswertungsschritte	21
<i>Abb. 5:</i> Histogramm von Chromosom 9	23
<i>Abb. 6:</i> Histogramm von 30 invasiv duktalem Mammakarzinomen	24
<i>Abb. 7:</i> Histogramm von 20 invasiv lobulären Mammakarzinomen	25
<i>Abb. 8:</i> Arithmetisches Mittel der DNA-Aberrationen pro Tumorfall	26
<i>Abb. 9:</i> Anzahl der DNA-Gewinne und -Verluste	29
<i>Abb. 10:</i> DNA-Gewinne und -Verluste pro Tumorfall	29
<i>Abb. 11:</i> Differenzhistogramm von 30 invasiv duktalem und 20 invasiv lobulären Mammakarzinomen	30
<i>Abb. 12:</i> Chromosomale Verteilung von DNA-Gewinnen und -Verlusten	31
<i>Abb. 13:</i> Differenzhistogramme bei gut und schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinomen (Chromosomen 5 und 21)	32
<i>Abb. 14:</i> Differenzhistogramm von Östrogenrezeptor-positiven und –negativen invasiv duktalem Mammakarzinomen	33
Tabelle 1: Klinisch-pathologische Daten der invasiv duktalem Mammakarzinome	14
Tabelle 2: Klinisch-pathologische Daten der invasiv lobulären Mammakarzinome	15
Tabelle 3: Chromosomale DNA-Alterationen in invasiv duktalem Mammakarzinomen	27
Tabelle 4: Chromosomale DNA-Alterationen in invasiv lobulären Mammakarzinomen	28

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

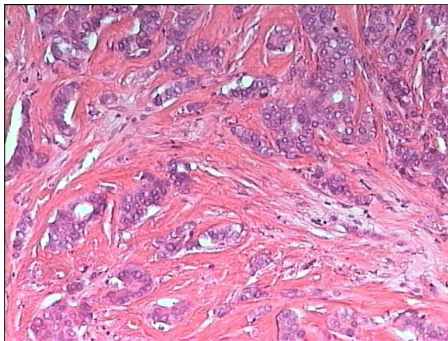
Brustkrebs ist weltweit die häufigste Tumorerkrankung der Frau und das mit steigender Tendenz. Es wird geschätzt, daß in Deutschland jährlich mehr als 40000 Neuerkrankungen auftreten und daß jede 14. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt (Chang-Claude et al., 1995).

Die Mehrheit der Mammakarzinome tritt sporadisch auf. Nur etwa 10% aller auftretenden malignen Brusttumoren sind auf hereditäre Faktoren zurückzuführen. Seit vielen Jahren gilt die familiäre Häufung von Brustkrebs als gesicherter und streng zu beachtender Risikofaktor (Schneider et al., 1986).

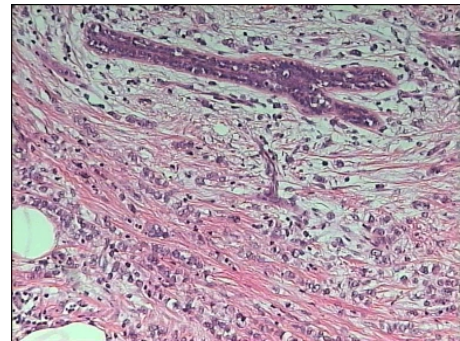
Das Mammaparenchym unterliegt zyklusabhängigen hormonellen Schwankungen. Die biologischen Besonderheiten und die spezifische enzymatische Aktivität können schon bei relativ geringen Tumervolumina zu einem Einbruch in Lymph- und Blutgefäße führen (Bender und Schnürch, 1991). Studien haben gezeigt, daß für die Entstehung von invasivem Brustkrebs proliferative Brusterkrankungen, wie z.B. die atypische Hyperplasie oder die proliferierende Mastopathie, hinreichende Risikofaktoren darstellen (Kelsey und Berkowitz, 1988; Kelsey und Gammon, 1990). Außerdem geht dem invasiven Karzinom häufig ein Carcinoma in situ voraus (Page und Dupont, 1990, James et al., 1997).

Das Mammakarzinom ist ein epithelialer Tumor des Brustdrüsenparenchyms. Die Mehrzahl der Mammakarzinome gehört dem invasiv duktalem Typ an (70-80%), gefolgt von invasiv lobulären (10-15%). Seltene Formen mit überwiegend guter Prognose sind das medulläre, das muzinöse, das tubuläre und das papilläre Karzinom (Böcker und Kunze, 1997). ‚Duktal‘ oder ‚lobulär‘ beschreibt nicht notwendigerweise den Ursprungsort der Neoplasien. Studien von Wellings et al. (1975) haben gezeigt, daß die Mehrzahl der Mammakarzinome sowohl des duktalem als auch des lobulären Typs von der terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE) ausgeht. Die Zellen in der TDLE teilen, vermehren und differenzieren sich sehr schnell, um sich an die physiologischen Bedingungen der Brustdrüse anzupassen. Somit sind sie anfälliger für genetische Mutationen, die dann zu abnormer proliferativer Aktivität und Neoplasie führen (Tavassoli, 1992). Hinsichtlich des histologischen Wachstumsmusters unterscheiden sich invasiv duktales von invasiv lobulären Mammakarzinomen (Abbildung 1). Das invasiv

duktale Karzinom zeichnet sich durch unregelmäßige, unterschiedlich breite, kohäsiv wachsende Tumorkomplexe häufig assoziiert mit drüsig/tubulärer Differenzierung aus. Das histologische Bild des invasiv lobulären Karzinoms wird durch ein dissoziiertes Wachstum mit einzelnen, hintereinander liegenden Tumorzellen geprägt, wofür häufig der Begriff des ‚Gänsemarschmusters‘ verwendet wird (Böcker und Kunze, 1997).



a)



b)

Abbildung 1: Histologische Beispiele für ein a) invasiv duktales und b) invasiv lobuläres Mammakarzinom.

Silverstein et al. (1994) und Yeatman et al. (1995) untersuchten die Unterschiede von invasiv lobulären und invasiv duktalem Tumoren hinsichtlich des klinischen Verhaltens, der Histopathologie und Prognose. Dabei zeigten sie, daß Patienten mit invasiv lobulärem Karzinom oftmals älter waren als solche mit duktalem Karzinom und außerdem einen größeren Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose aufwiesen. Die Patienten mit invasiv lobulären Karzinomen hatten auch ein höheres Risiko für den Befall der kontralateralen Brust. Der Prozentsatz an Lymphknotenmetastasen war jedoch geringfügig kleiner (32% versus 37%). Einige prognostische Faktoren, wie histologischer Grad, Ploidie/DNA-Index, S-Phasen-Fraktion sowie Hormonrezeptorgehalt waren für Patienten mit invasiv lobulären Karzinomen günstiger als bei Patienten mit invasiv duktalem Karzinomen, was zu einer längeren krankheitsfreien Überlebensdauer für Patienten mit lobulären Brusttumoren führte. Sinn et al. (1997) vertreten die Auffassung, daß die Langzeitprognose zwischen beiden Tumorarten ähnlich ist, invasiv lobuläre Karzinome aber ein langsames Tumorwachstum aufweisen. Letzteres führt bei invasiv lobulären Karzinomen häufig zu einer multifokalen Tumormanifestation. Das trägt dazu bei, daß sie mammographisch und palpatorisch schlechter zu lokalisieren sind. Abweichend von diesen Studien sahen Casolo und Mitarbeiter (1997) beim Vergleich von jeweils 117 Patienten mit invasiv lobulären und invasiv duktalem Mammakarzinomen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Tumorgröße,

Lymphknotenbeteiligung, histologischem Grad und Hormonrezeptorstatus. Die Autoren betrachteten die Multifokalität als einzigen Unterschied beider Tumorarten.

Gesichert ist, daß Brustkrebs eine sowohl genetisch (Sato et al., 1990) als auch histologisch (Silverstein et al., 1994) äußerst heterogene Erkrankung darstellt, und der Krankheitsverlauf demzufolge sehr variabel ist. Für ein besseres Verständnis der Entstehung und des Verlaufs dieser Erkrankung ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zu phänotypischer Heterogenität führen, von entscheidender Bedeutung.

1.2. Komparative genomische Hybridisierung

Die komparative genomische Hybridisierung (engl. comparative genomic hybridization, CGH) ist eine Anfang der neunziger Jahre entwickelte molekulargenetische Methode und erlaubt einen Vergleich zwischen Tumor- und Normal-DNA auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene (Kallioniemi et al., 1992, du Manoir et al., 1993). Mit einer einzigen Hybridisierung kann das gesamte Genom auf DNA-Aberrationen im Tumor untersucht werden („Screening“), was einen bedeutenden Vorteil der CGH gegenüber Verfahren wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, Southern Blot-Hybridisierung und RFLP-Analyse darstellt. Außerdem können sowohl frisch eingefrorene Gewebsproben als auch in Paraffin eingebettetes Material zur Tumor-DNA-Gewinnung genutzt werden. Die Verwendung von archiviertem Gewebe ermöglicht u.a. den Vergleich der genetischen Aberrationen zwischen Primärtumor und später auftretenden Fernmetastasen (Isola et al., 1994). Es werden nur geringe Mengen an Tumor-DNA benötigt (1µg). Das Auflösungsvermögen der CGH liegt für DNA-Deletionen im Bereich einer chromosomalen Bande (ca.10 Megabasen) (Petersen et al., 1996, Bentz et al., 1998a). Bei DNA-Gewinnen steigt das Auflösungsvermögen auf Werte um 100 Kilobasen, was darauf zurückzuführen ist, daß hierbei eine DNA-Sequenz mehrfach amplifiziert sein kann (Kallioniemi et al., 1994b). Die CGH eignet sich nicht zum Nachweis tumorspezifischer, balanzierter Translokationen oder Punktmutationen (Cremer et al., 1995, Petersen et al., 1996).

Zahlreiche Studien an unterschiedlichen Tumoren haben ergeben, daß die Überexpression von Onkogenen einerseits (Devilee et al., 1994, Terada et al., 1998; Staibano et al., 1998) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen andererseits (Hampton et al., 1994, Brewster et al., 1994, Dorion-Bonnet et al., 1995, Clifford et al., 1998) häufig zu beobachten sind. Bedeutungsvoll für molekulargenetische Untersuchungen ist, daß die Onkogen-Aktivierung

mit DNA-Gewinnen (-Überrepräsentierungen, -Amplifikationen) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen mit DNA-Verlusten (-Unterrepräsentierungen, -Deletionen) verbunden sind. Aufgrund des „Screening“-Charakters der CGH wurde sie bei einer Vielzahl von genetischen Untersuchungen unterschiedlicher Tumorgruppen angewandt, wie z.B. bei Bronchialkarzinomen (Ried et al., 1994, Petersen et al., 1997), Pankreaskarzinomen (Mahlamaki et al., 1997), Karzinomen der Kopf-Hals-Region (Bockmühl et al., 1997), Ovarialkarzinomen (Sonoda et al., 1997), Blasenkarzinomen (Voorter et al., 1995, Sauter, 1997), Meningiomen (Weber et al., 1997, Carlson et al., 1997), Prostatakarzinomen (Cher et al., 1994, Nupponen et al., 1998) und Leukämien (Bentz et al., 1995, Willem und Mendelow, 1997). CGH-Untersuchungen an Mammakarzinomen und Brustkrebszelllinien beschrieben ein komplexes Muster an DNA-Gewinnen und -Verlusten des Tumors gegenüber dem Normalgewebe (Kallioniemi et al., 1992; Kallioniemi et al., 1994a, Nishizaki et al., 1995, Ried et al., 1995, Courjal und Theillet, 1997, James et al., 1997, Nishizaki et al., 1997a, Nishizaki et al., 1997b, Schwendel et al., 1998a). Häufig vorkommende Regionen mit DNA-Zugewinnen wurden auf den Chromosomen 1q, 6p, 8q, 11q, 16p, 17q, 19p,q und 20q detektiert. DNA-Verluste kamen gehäuft auf 6q, 13q, 16q, 17p und 22q vor.

1.3. Bekannte genetische Alterationen in invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinomen

Wichtige an der Kanzerogenese der Brust beteiligte Onkogene sind erbB-2 (Clark und McGuire, 1991, Tsuda et al., 1989), c-myc (Bland et al., 1995) und cyclin D1 (Courjal et al., 1996) sowie das Tumorsuppressorgen p53 (Deng et al., 1994).

Seit längerem werden genetische Unterschiede zwischen beiden Tumorarten diskutiert und es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression des erbB-2 Onkogens (Kreipe et al., 1993) und des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor-) (Martinazzi et al., 1993) sowie Mutationen des p53 Suppressorgens (Marchetti et al., 1993) weniger häufig in invasiv lobulären Tumoren als in invasiv duktalem Tumoren auftreten.

Eine Region mit häufig beobachteten DNA-Verlusten liegt auf dem langen Arm von Chromosom 16. Das E-cadherin Gen, ein Tumorsuppressorgen, ist auf 16q22.1 lokalisiert und kodiert für ein calciumabhängiges Zelladhäsions-Molekül (Takeichi, 1991). Die verminderte Expression des E-cadherin Gens steht in der Mehrzahl der Fälle mit dem lobulären Phänotyp in Verbindung (Moll et al., 1993, Bukholm et al., 1997). Weiterhin scheint die verminderte Expression von E-cadherin ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese von lobulären

Karzinomen zu sein. Vos et al. (1997) untersuchten in 6 Fällen von Carcinoma lobulare in situ (CLIS) und 150 Fällen von duktalem Carcinoma in situ (DCIS) die E-cadherin Expression mittels immunhistochemischer Färbung. In allen Fällen von CLIS war eine Expression nicht nachweisbar, im Gegensatz dazu war sie in allen 150 DCIS vorhanden.

Bei der Untersuchung von invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinomen mit anderen molekulargenetischen Methoden wurden z.T. kontroverse Ergebnisse erzielt. Aldaz et al. (1995) untersuchten mit Hilfe der Microsatelliten-Längen-Polymorphismus-Analyse genetische Aberrationen an einem Kollektiv von 23 lobulären und 29 duktalem Fällen. Hierbei wurden Imbalancen in den Regionen 1q, 13q, 16q, 17p und 18q vermehrt in invasiv duktalem Karzinomen beobachtet. DNA-Verluste auf 8p waren häufiger beim lobulären Phänotyp zu finden. Vermehrte Alterationen in invasiv duktalem Tumoren im Vergleich zu invasiv lobulärem zeigten sich auf Chromosom 1 auch durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (Farabegoli et al., 1996). Eine größere Frequenz von 8p-Deletionen in invasiv lobulärem Karzinomen wurden durch weitere Untersuchungen auf Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) bestätigt (Seitz et al., 1997). Weiterhin wurden mittels LOH Alterationen auf 11p15 (Garcia-Foncillas et al., 1996) mit größerer Häufigkeit bei invasiv lobulärem Mammakarzinomen nachgewiesen.

Ein Vergleich von 46 invasiv duktalem Mammakarzinomen und 19 invasiv lobulärem Mammakarzinomen mittels CGH (Nishizaki et al., 1997b) zeigte, daß die Gesamtanzahl chromosomaler Veränderungen in invasiv duktalem Tumoren größer als in invasiv lobulärem Tumoren war. Vor allem DNA-Zugewinne auf 8q und 20q zeigten in invasiv duktalem Tumoren eine signifikant größere Frequenz. Nach Ansicht der Autoren lassen die vermehrten Zugewinne auf 8q und 20q einen stärkeren Einfluß auf hier lokalisierte Onkogene bei duktalem Brustkrebs vermuten. DNA-Deletionen auf 16q waren im Gegensatz dazu in invasiv lobulärem Karzinomen häufiger zu finden, was mit den Ergebnissen von Moll et al. (1993) und Bukholm et al. (1997) korreliert. Häufige DNA-Deletionen betrafen insgesamt die Chromosomen 6q, 13q, 17p und X, DNA-Gewinne die Chromosomen 1q und 17q. In einer früheren CGH-Studie von Nishizaki et al. (1995) wurden beim Vergleich von 20 invasiv lobulärem und 79 invasiv duktalem Mammakarzinomen ähnliche Ergebnisse erzielt. Neben geringeren DNA-Gewinnen auf 8q und häufigeren Gewinnen auf 1q wurde eine höhere Frequenz von DNA-Verlusten auf 16q, 18q und X bei invasiv lobulärem Mammakarzinomen festgestellt.

1.4. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag leisten zur Beantwortung der folgenden Fragen:

- Läßt sich ein bestimmtes Muster chromosomaler Alterationen bei invasiv duktalem sowie invasiv lobulärem Mammakarzinom feststellen ?
- Unterscheidet sich das chromosomale Muster bei gut und schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom ?
- Gibt es Unterschiede bei den DNA-Aberrationen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorgehalt der untersuchten invasiv duktalem Mammakarzinome ?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

DNA-Extraktion

Digestionspuffer (50mM Trispuffer, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20)

Trispuffer (pH 8,5) [Sigma]

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,0) [Sigma]

Tween 20 [Boehringer Mannheim]

Proteinase K [Boehringer-Mannheim]

Xylol

Ethanol [Sigma]

Phenol [Sigma]

Chloroform [Sigma]

Isoamylalkohol [Sigma]

Isopropanol [Sigma]

NaCl [Sigma]

Aqua ad iniectionabile [Braun Melsungen]

Präparation der Metaphasenchromosomen

RPMI Medium 1640 [Sigma]

Penicillin/Streptomycin [Sigma]

L-Glutamin [Sigma]

Steril filtriertes fötales Kälberserum [Sigma]

Phytohämagglutinin [Sigma]

Colcemid [Sigma]

KCl (0,075 M) [Sigma]

Fixativ (Methanol/Eisessig, 3/1) [Sigma]

DNA-Markierung (Nick-Translation)

Biotin-dUTP [Boehringer-Mannheim]

Digoxigenin-dUTP [Boehringer-Mannheim]

Reaktionspuffer (10x: 0,5 M Tris pH 8, 50mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA)

MgCl₂ [Sigma]
BSA [Sigma]
Beta-Mercaptoethanol [Sigma]
DNase [Boehringer-Mannheim]
Kornberg DNA Polymerase [Boehringer-Mannheim]
dATP [Boehringer-Mannheim]
dCTP [Boehringer-Mannheim]
dGTP [Boehringer-Mannheim]
dTTP [Boehringer-Mannheim]
Agarose [Boehringer-Mannheim]
20xSSC (Sodium Chloride/Sodium Citrate Puffer)
Ethidiumbromid [Sigma]
EDTA [Sigma]
SDS [Sigma]

Hybridisierung und DNA-Nachweis

Humane Cot1-DNA [Gibco BRL, Life Technologies]
Heringssperma-DNA [Promega]
Natriumacetat [Sigma]
Ethanol [Sigma]
Formamid (FA) [Merck]
Mastermix (4xSSC, 0,1 % Tween + 20% Dextransulfat)
Anti-Dig-Rhodamin [Boehringer-Mannheim]
Fluorescein-Avidin [Vector Laboratories, USA]
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid) [Sigma]
DABCO (1,4 Diazobicyclooctan)
Fixogum Rubber cement [Marabu]

Geräte für die DNA-Präparation

Gefriermikrotom [Frigocut 2800-E, Reichert-Jung]
Eppendorf-Zentrifuge [5415 C, Eppendorf]
Wärmeblock für Eppendorf-Tubes [Thermomixer 5436, Eppendorf]
Photometer [Gene Quant II, Pharmacia Biotech]

SpeedVac [Savant, Life Sciences]
Magnetrührer mit Heizplatte [NeoLab]
Wasserbäder [Gesellschaft für Labortechnik mbH]
Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer [BIO-RAD]
UV-Transilluminator mit Gel-Dokumentations-Einheit [Hoefer]
Kühlzentrifuge für Eppendorf-Tubes [5402, Eppendorf]
Phasenkontrastmikroskop Axiolab [Zeiss, Oberkochen]
Wärmeofen [Heraeus]
Wärmeplatte [NeoLab]

Geräte für die Bildaufnahme und Bildverarbeitung

Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskop [Zeiss, Oberkochen]
Plan NEOFLUAR Ölobjektiv 63fach, N.A. 1.25 [Zeiss, Oberkochen]
Filtersätze [Zeiss, Oberkochen]:
DAPI: Zeiss Filtersatz 02, Exzitation G365, Strahlenteiler FT 395, Emission LP 420
FITC: Zeiss Filtersatz 10, Exzitation BP 450-490, Strahlenteiler FT 510, Emission BP 515-565
TRITC: Chroma Filtersatz HQ Cy3 plus Zeiss Exzitation Filtersatz 15, Exzitation BP 546/12, Strahlenteiler FT 565, Emission BP 570-650
CCD-Kamera (Charge-Coupled-Device) [Photometrics, Arizona, USA]
Apple Macintosh-Computer Quadra 900 [USA]
Pentium Personal-Computer mit Zip-Disketten-Laufwerk
Farb-Tintenstrahldrucker Canon BJC 610

Software

Nu 200 2.0 für Apple Macintosh
Canvas 3.5 für Apple Macintosh
CGH-Software [AMBA-System, Karyotypisierungsmodul KARYOTYP (IBSB GmbH, Berlin): Programme „CGH“, „CGHeval“, „CGHSuper“
Betriebssystem Microsoft Windows 95

2.2. Methoden

Eine rasche und umfassende Analyse eines Genoms auf über- und unterrepräsentierte DNA-Abschnitte erlaubt die Methode der komparativen genomischen Hybridisierung. Die methodischen Schritte der CGH-Analyse sind in Abbildung 2 dargestellt und sollen im weiteren näher beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll von Schwendel et al. (1998a) mit geringen Modifizierungen verwendet.

Komparative genomische Hybridisierung

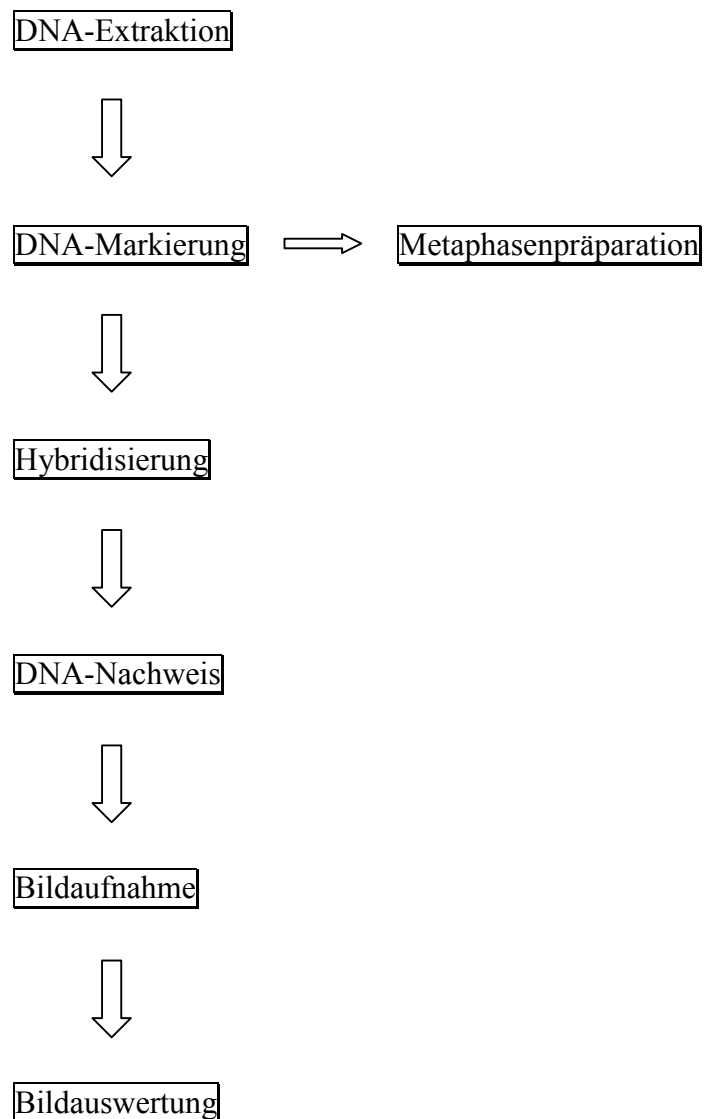


Abbildung 2: Methodische Schritte der CGH-Analyse.

2.2.1. Tumormaterial

Das Tumorgewebe wurde von 30 Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinom sowie 20 Patientinnen mit invasiv lobulärem Mammakarzinom gewonnen. In der Mehrzahl der Fälle wurde Tumormaterial im Rahmen der intraoperativen Schnellschnittuntersuchung gewonnen, welches bis zur DNA-Extraktion bei -80°C aufbewahrt wurde. Bei den restlichen Proben handelte es sich um Paraffin-eingebettete Tumorproben. Die Tabellen 1 und 2 zeigen eine Auflistung der untersuchten Mammakarzinome mit zugehörigem Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Tumorentnahme, histologischem Grad, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Östrogenrezeptor-Status. Das Grading und Staging erfolgte entsprechend den geltenden Kriterien der UICC (Wittekind und Wagner, 1997).

Tabelle 1: Klinisch pathologische Daten der untersuchten invasiv duktalem Mammakarzinome.

Fall-Nr.	Alter	Malignitätsgrad	Stadium	Östrogenrezeptoren
1	42	G1	pT2. N0	ja
2	57	G1	pT1c. N0	ja
3	81	G1	pT1c. N0	ja
4	59	G1	pT1c. N1a	ja
5	72	G1	pT2. NX	ja
6	76	G1	pT1. N1bi	ja
7	67	G1	pT1c. N0	ja
8	61	G1	pT1c. N0	ja
9	59	G1	pT2. N1bi	keine Angaben
10	44	G3	pT1c. N1	ja
11	71	G3	pT2. N1a	nein
12	53	G3	pT1. N0	nein
13	72	G3	pT2. N0	ja
14	61	G3	pT1c. NX	ja
15	53	G3	pT2. N0	nein
16	59	G3	pT1b. N0	ja
17	58	G3	pT1. N0	ja
18	55	G3	pT2. N0	nein
19	74	G3	pT4. NX	ja
20	68	G3	pT1c. N1bi	ja
21	34	G3	pT2. N0	nein
22	58	G3	pT1. N0	ja
23	48	G3	pT1c. N0	nein
24	58	G3	pT2. NX	ja
25	41	G3	pT2. N0	ja
26	50	G3	pT2. N0	nein
27	47	G3	pT1b. N0	ja
28	59	G3	pT4. NX	ja
29	79	G3	pT1c. NX	ja
30	55	G3	pT2. N0	nein

Tabelle 2: Klinisch pathologische Daten der untersuchten invasiv lobulären Mammakarzinome.

Fall-Nr.	Alter	Malignitätsgrad	Stadium	Östrogenrezeptoren
31	60	G1	pT1c, N1bi	ja
32	56	G1	pT2, N0	ja
33	46	G1	pT1c, N0	ja
34	68	G1	pT1c, N0	ja
35	76	G1	pT4, N1biii	ja
36	68	G1	pT4, NX	ja
37	58	G1	pT1c, N0	ja
38	48	G2	pT1c, N0	ja
39	79	G2	pT2, N1biv	ja
40	55	G2	pT2, N1bii	ja
41	83	G2	pT2, NX	ja
42	88	G2	pT2, N0	nein
43	55	G2	pT3, N1biii	ja
44	74	G2	pT2, Nx	ja
45	62	G2	pT1c, N0	ja
46	54	G2	pT3, NX	ja
47	41	G2	pT1c, N0	ja
48	53	G2	pT2, N1bii	ja
49	63	G3	pT2, N0	ja
50	59	G3	pT2, NX	ja

2.2.2. DNA-Extraktion

Von den tiefgefrorenen Tumorproben wurden am Gefriermikrotom 20-30 Schnitte (Schnittdicke 30µm) angefertigt, mit 900 µl Digestionspuffer versetzt und mit 20-30 µl Proteinase K bei 50°C inkubiert. Im Falle von paraffin-asserviertem Tumorgewebe wurde zu den Mikrotomschnitten 1,5-2ml Xylol zum Entparaffinieren zugegeben. Danach wurden die Proben zweimal für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und dekantiert. Nach einem Waschvorgang mit 1-2 ml absolutem Alkohol und Trocknung der Proben erfolgte die Proteinase K-Behandlung. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Zugabe eines Gemisches von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25/24/1). Auf jede Extraktion folgten je 10 Minuten Schütteln und Zentrifugieren. Nach dreimaligem Extrahieren wurden die Proben zur DNA-Fällung mit 1 ml Isopropanol und 90µl einer 3 M NaCl-Lösung versetzt und für eine Stunde bei -80°C belassen. Danach erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C, Dekantieren, Waschen der Pellets mit 70% Ethanol und nochmaliges Zentrifugieren und Dekantieren. Nach dem Trocknen wurden die Proben in Aqua ad iniectabile gelöst. Anschließend wurden Aliquots der Proben im Verhältnis 1:20 (5µl DNA + 95 µl Aqua ad iniectabile) verdünnt und die Konzentration mit dem Photometer anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.2.3. Präparation der Metaphasenchromosomen

Eine Kurzzeitkultur von Blutlymphozyten mit folgendem Ansatz:

- 40ml RPMI Medium 1640
- 8ml steril filtriertes fötales Kälberserum
- 400µl Phytohämagglutinin (Zugabe, um Lymphozyten zur Proliferation anzuregen)
- 2ml Vollblut (heparinisiert)

war Voraussetzung für die Präparation von Metaphasenchromosomen.

Die Kultur erfolgte für 72 Stunden bei 37°C. Unter Zugabe von Colcemid wurden die Lymphozyten in der Metaphase arretiert und mit Fixativ (Methanol/Eisessig; 3/1) gewaschen sowie zentrifugiert. Beim Auftropfen der Lösung mit den Zellkernen auf die Objektträger ist darauf zu achten, daß eine gute Spreitung der Metaphasenchromosomen erfolgt, da dies eine Grundvoraussetzung für eine hohe Qualität der nachfolgenden Hybridisierung ist. Da sowohl weibliches als auch männliches Spenderblut für die Metaphasengewinnung verwendet wurde, sind die Chromosomen X und Y nicht in die spätere Auswertung miteinbezogen worden. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur. Die Objektträger mit den Metaphasenchromosomen der Firma Vysis wurden bei –20°C gelagert.

Zur Denaturierung der Metaphasenchromosomen wurden zwei unterschiedliche Verfahrensweisen angewendet:

- Auf die selbstpräparierten Metaphasenchromosomen wurden 120 µl Denaturierungslösung getropft und dann mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend erfolgte die Denaturierung bei 77°C für 45 Sekunden. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung gewaschen (70%, 90% und 100% EtOH) und anschließend luftgetrocknet.
- Zur Denaturierung der Vysis-Metaphasenchromosomen wurde eine Denaturierungslösung (49 ml Formamid, 7 ml 20xSSC, 14ml Aqua bidest.) auf einen pH-Wert von 7,0-7,5 eingestellt und auf 73°C erwärmt. Die Objektträger denaturierten 5 Minuten in der Lösung und wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

2.2.4. DNA-Markierung (Nick-Translation)

Während der Nick-Translation werden durch die DNase Einzelstrangbrüche („Nicks“) in der DNA erzeugt. An die so entstandenen Fragmentenden werden unter Vermittlung der DNA-Polymerase die eingesetzten Nukleotide (dNTPs und Hapten-markierte dUTPs) angelagert und eine neue doppelsträngige DNA synthetisiert. Im Falle der Tumor-DNA wurde Biotin-dUTP verwendet und im Falle der Normal-DNA Digoxigenin-dUTP. Die an dUTP gekoppelten Haptene Biotin bzw. Digoxigenin werden nun an Stelle des Nukleotids dTTP in die Tumor- bzw. Normal-DNA eingebaut.

Für die Nick- Translation wurde ein Mix aus folgenden Reagenzien hergestellt :

Mix

Reaktionspuffer (10x: 0,5M Tris pH 8, 50mM MgCl ₂ , 0,5mg/ml BSA)	5µl
Beta-Mercaptoethanol (0,1 M)	5µl
dNTPs : dATP, dCTP, dGTP je 0,5 mM, dTTP 0,1mM	5µl
ein modifiziertes Nukleotid: Biotin-dUTP oder Digoxigenin-dUTP	2µl
DNase (3mg/ml, 1:2000 verdünnt)	1µl
Kornberg DNA-Polymerase	1µl
<hr/>	
5 µg Tumor-DNA oder 5 µg Normal-DNA, Aqua ad iniectabile	31µl
	Σ 50 µl

Nach einer Inkubation von 20 Minuten im Wasserbad (15°C) wurden zur Überprüfung der Fragmentlängen Aliquots der Proben mittels Gel-Elektrophorese getestet (1,5% Agarosegel, 1µl Ethidiumbromid). Die entstandenen Biotin- oder Digoxigenin-markierten DNA-Fragmente sollten eine Fragmentlänge zwischen 200-500 bp aufweisen. Der Abbruch der Nick-Translation erfolgte durch Zugabe von 2µl EDTA und 2µl SDS. Die Proben wurden bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

2.2.5. Hybridisierung

Bei der Hybridisierung werden die Nick-translatierte Tumor-DNA sowie die Normalgewebs-DNA zu gleichen Teilen auf die Metaphasenchromosomen hybridisiert, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren. Im einzelnen wurden die folgenden Reagenzien vermischt:

- 10µl Tumor-DNA (Biotin-markiert)
- 10 µl Normal-DNA (Digoxigenin-markiert)
- 30 µl humane Cot1-DNA
- 1 µl Heringssperma-DNA
- 5,1 µl 3 M Natriumacetat-Lsg.
- 150 µl 100% Ethanol (-20°C)

Die Cot1-DNA bindet an die repetitiven DNA-Sequenzen am Heterochromatin der Chromosomen. Die Probe wurde dann für 30 Minuten bei -80°C gelagert und anschließend zentrifugiert (4°C , 14000 rpm), dekantiert und luftgetrocknet. Zur Resuspendierung der DNA wurde das Pellet in 5 µl Formamid aufgenommen und bei 37°C in Lösung gebracht. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl Mastermix und die DNA-Denaturierung für 5 Minuten bei 77°C . Zur Vorhybridisierung wurde die DNA bei 37°C 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 12 µl der DNA-Lösung auf einem Objektträger mit denaturierten Metaphasen aufgebracht, mit Deckgläsern abgedeckt und mit ‚rubber cement‘ abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte in einer Instrumentenschale aus Metall für 3 Tage in einem Wasserbad bei 37°C .

2.2.6. DNA-Nachweis

Der DNA-Nachweis beinhaltet die Visualisierung der beiden Genome mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen. Nach erfolgter DNA-Hybridisierung wurden die Objektträger zunächst einem mehrfachen Waschvorgang unterzogen:

Formamid/ 2x SSC (50:50)	3x2 Min.	37°C
0,1x SSC	3x2 Min.	60°C
4xSSC/ 0,1% Tween	1x5 Min.	37°C
3% BSA in 4x SSC/ 0,1% Tween 20	15 Min.	37°C
4x SSC/ 0,1% Tween 20	1x5 Min.	37°C

Die Fluorochrommarkierung erfolgte durch Auftropfen von 125 µl Gebrauchslösung (10 µl Anti-Dig-Rhodamin (TRITC), 7 µl Fluoreszein-Avidin (FITC) auf 1ml 3% BSA) auf je einen Objektträger, der für 25 Minuten bei 37°C im feuchten Milieu aufbewahrt wurde. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Chromosomen 3x2 Minuten bei 45°C mit 4xSSC/ 0,1% Tween

gewaschen. Danach erfolgte die Überführung der Objektträger in eine DAPI-Lösung (40ng/ml) für 5 Minuten bei Zimmertemperatur, um anhand der DAPI-Bänderung später die Chromosomen zu karyotypisieren. Zur Verzögerung des Ausbleichens der fluorochrommarkierten Chromosomen wurden 35 µl DABCO aufgetragen und die Objektträger bis zur Bildaufnahme bei 4°C gelagert.

2.2.7. Bildaufnahme

Die Aufnahme der markierten Metaphasen erfolgte mittels eines Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskops. Durch selektive Filter ist es möglich, die Fluoreszenzsignale der einzelnen Fluorochrome getrennt voneinander aufzunehmen und eine Interferenz der Fluoreszenzsignale zu verhindern. Für die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder wurde eine CCD-Kamera und ein Apple Macintosh Computer mit dem Softwareprogramm Nu200 2.0 benutzt. Pro Metaphase wurden das FITC-, TRITC- und DAPI-Bild aufgenommen (Abbildung 3). Die Belichtungszeiten hingen von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab. Die Standardbelichtungszeiten bei guten Fluoreszenzsignalen lagen bei etwa 1-3 Sekunden für FITC, 1-5 Sekunden für TRITC und 0,1-0,5 Sekunden für DAPI. Die von der CCD-Kamera aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden als Dateien im 8 bit-Tiff-Format (256 Graustufen) gespeichert. Es wurden 15 Metaphasenchromosomen pro Fall aufgenommen, so daß insgesamt 45 Bilder (je 15 für FITC, TRITC, DAPI) vorlagen.

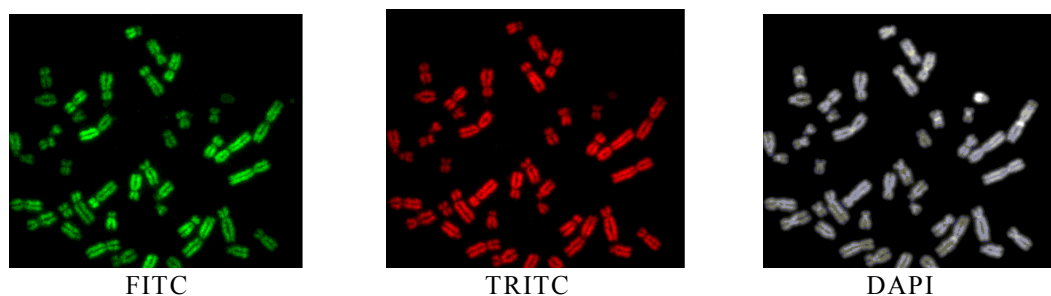


Abbildung 3: Chromosomenmetaphase im FITC-, TRITC- und DAPI-Bild.

2.2.8. Bildverarbeitung und Auswertung

Die Bearbeitung der digitalisierten Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe einer CGH-Software, die im Institut für Pathologie der Charité hergestellt wurde (Roth et al., 1996). Es basiert wiederum auf dem Karyotypisierungsprogramm KARYOTYP (IBSB GmbH, Berlin). Zur Erstellung des CGH-Karyogramms sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

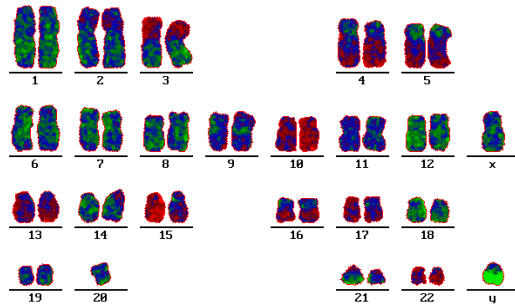
- Bildsegmentation und Konturierung der Chromosomen
- Übereinanderlagerung der drei Fluoreszenzbilder und Korrektur des optischen Versatzes
- Separieren zusammenhängender Chromosomen und Entfernung überflüssiger Bildobjekte
- Karyotypisierung der Chromosomen

Während der Bildsegmentation wurde das DAPI-Bild jeder Metaphase eines Falles vom Hintergrundbild getrennt. Das DAPI-Bild diente als Vorlage gegenüber der nachfolgenden Shift-Korrektur der Chromosomen im FITC- und TRITC-Bild, da es während der Aufnahme der drei Fluoreszenz-Bilder durch den manuell durchgeführten Filterwechsel zu einem optischen Versatz kommen kann. Alle Schritte, die zur Herstellung des Karyogramms durchgeführt werden mußten, erfolgten sichtbar am DAPI-Bild. Diese Schritte wurden vom Computer simultan im Hintergrund auch am FITC- und TRITC-Bild durchgeführt. Aus den korrigierten FITC- und TRITC-Bildern wurde das FITC/TRITC- Verhältnisbild (Ratio-Bild) berechnet. Hierbei wurden die Graustufenwerte der Chromosomen beider Bilder skaliert und mittels Falschfarben kodiert. Rote Färbungen der Chromosomen entsprachen einem DNA-Verlust als Ausdruck vermehrter Anlagerung von TRITC-markierter Normal-DNA an die chromosomale DNA. Grüne Färbungen stellten einen DNA-Gewinn dar, d.h. die vermehrte Anlagerung von FITC-markierter Tumor-DNA. Bei einer Gleichverteilung zwischen Tumor- und Normal-DNA erschienen die Chromosomen blau. Die einzelnen Chromosomen wurden schließlich manuell am Computer in ein vorhandenes Karyogramm eingeordnet.

Die nachfolgenden Bildauswertungsschritte sind in Abbildung 4 dargestellt.

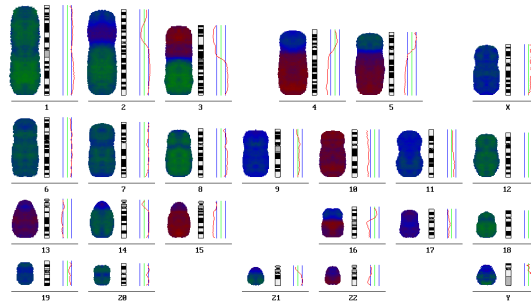
Karyogramm

Ratio-Bild nach Analyse einer Metaphase

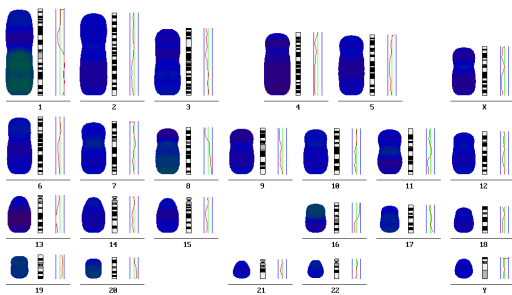


Summenkaryogramm

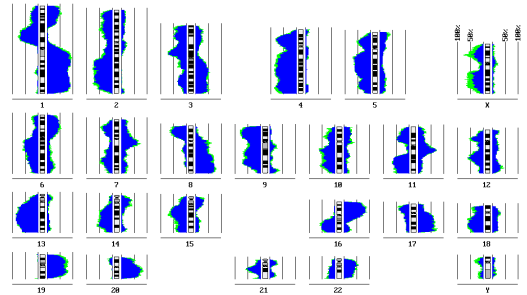
basierend auf der Analyse von 15 Metaphasen



Superkaryogramm und Histogramm
zur Analyse von mehreren Tumoren einer Entität



Superkaryogramm



Histogramm

Abbildung 4: CGH-Bildauswertungsschritte.

Die Ermittlung von genetischen Veränderungen in einem Tumorfall erfolgte anhand des CGH-Summenkaryogramms. Alle gleichen Chromosomen eines Falles wurden nach vorheriger geometrischer Angleichung rechnerisch zusammengefaßt und als gemittelte Chromosomen im Summenkaryogramm dargestellt. Zu jedem der errechneten farbigen Ratio-Chromosomen gehört ein eindimensionales Fluoreszenz-Quotienten-Profil (Ratio-Profil). Die mittlere grüne Linie verdeutlicht das Gleichgewicht zwischen Tumor- und Normal-DNA. Die blauen Linien links und rechts der Mittellinie entsprechen dem theoretischen Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten eines diploiden Tumors, der für ein bestimmtes Chromosom eine Mono- bzw. Trisomie in 50% der Tumorzellen aufweist. Die linke Linie entsprach somit einem Verhältnis FITC/TRITC von 0,75, die rechte Linie einem Verhältnis von 1,25. Bei Überschreitung einer gedachten Linie von 1,5 sprach man von einer hoch amplifizierten Region. Die Linien wurden als Schwellenwerte benutzt für die Bestimmung der DNA-Verluste und DNA-Gewinne in Tabelle 3 und 4 sowie in den Abbildungen 8-10 und 12. Der Verlauf der roten Kurve im Ratio-Profil repräsentierte das jeweilige Verhältnis der Fluoreszenzsignale von Tumor- zu Normal-DNA in der entsprechenden Chromosomen-Region.

Bei der Berechnung des Superkaryogramms wurden die Summenkaryogramme mehrerer untersuchter Tumorfälle zusammengefaßt. So können häufig vorkommende Veränderungen z.B. in einer Tumorentität ermittelt werden. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Tumorentitäten wurde durch die Erstellung eines Histogramms ermöglicht. Bei dieser Darstellungsweise wurden die DNA-Verluste und -Gewinne in Form einer Inzidenzkurve zu beiden Seiten der Chromosomenideogramme veranschaulicht. Beim Verlauf der Inzidenzkurve nach links entsprach dies einem DNA-Verlust und nach rechts einem DNA-Gewinn. Die einzelnen DNA-Veränderungen wurden bei der Histogrammdarstellung statistisch mit Hilfe eines Student-t-Tests bestimmt. Blaue Bereiche entsprechen dabei den Veränderungen mit 99% Signifikanz, grüne Bereiche schließen solche Veränderungen mit ein, die eine Signifikanz von 95% zeigten.

Für die Berechnung eines sog. Differenzhistogramm wurden dann aus zwei zu vergleichenden Tumorgruppen die unterschiedlichen Häufigkeiten der chromosomalen Veränderungen berechnet. Diese wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test auf ihre Signifikanz geprüft und mittels roter und grüner Inzidenzkurven zu beiden Seiten der Chromosomenideogramme dargestellt. Chromosomale Alterationen, die in einer der beiden Tumorgruppen signifikant

häufiger vorkamen, wurden mit grauer (99% Signifikanz) bzw. hellgrauer Schraffierung (95% Signifikanz) gekennzeichnet.

In Abbildung 5 ist das Einzel-Histogramm von Chromosom 9 bei (A) invasiv duktalem und (B) invasiv lobulärem Mammakarzinomen dargestellt sowie in (C) das errechnete Differenzhistogramm. Die beiden inneren senkrechten Linien zu beiden Seiten der Ideogramme kennzeichnen eine Inzidenz von 50%, die beiden äußeren Linien eine von 100%. Letztere würde vorliegen, wenn sämtliche Tumorproben an der gleichen chromosomalen Region eine identische Alteration aufweisen.

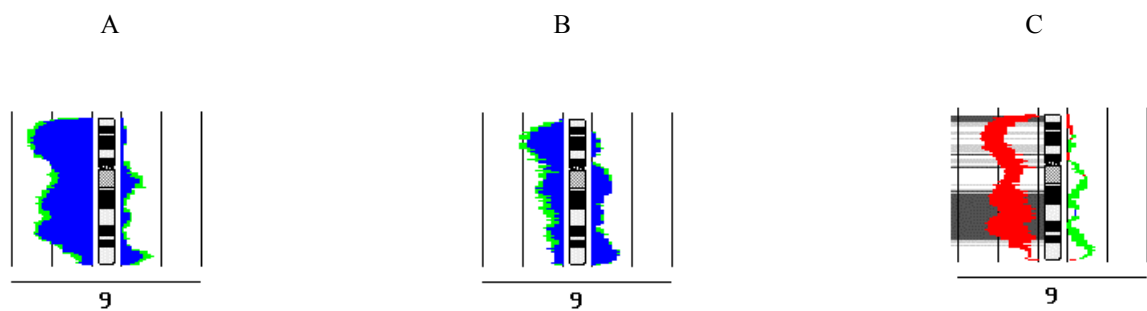


Abbildung 5: Histogramm von Chromosom 9 bei (A) invasiv duktalem (IDC) und (B) invasiv lobulärem (ILC) Mammakarzinomen, blau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, grün $\hat{=}$ 95% Signifikanz. (C): Darstellung des Differenzhistogramms: rot $\hat{=}$ Überschuss der chromosomalen Imbalancen in IDC, grün $\hat{=}$ Überschuss der chromosomalen Imbalancen in ILC, weiße Areale zwischen farbigen Anteilen und der 0% Inzidenzlinie $\hat{=}$ Anteil der gemeinsamen Veränderungen von IDC und ILC; grau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, hellgrau $\hat{=}$ 95% Signifikanz.

3. Ergebnisse

3.1. Genetische Alterationen in invasiv duktalem Mammakarzinomen

Die Abbildung 6 zeigt das Histogramm über alle genetischen Veränderungen in 30 invasiv duktalem Mammakarzinomen. Die blauen Bereiche kennzeichnen chromosomale Alterationen, die mit einer Signifikanz von 99% auftraten, die grünen Bereiche schließen solche mit ein, die nur eine 95%ige Signifikanz zeigten. Die Flächen links der Chromosomen-Ideogramme repräsentieren DNA-Verluste, rechts der Ideogramme werden DNA-Gewinne dargestellt. Chromosomale Bereiche, in denen das Heterochromatin lokalisiert ist, sowie die Chromosomen X und Y wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

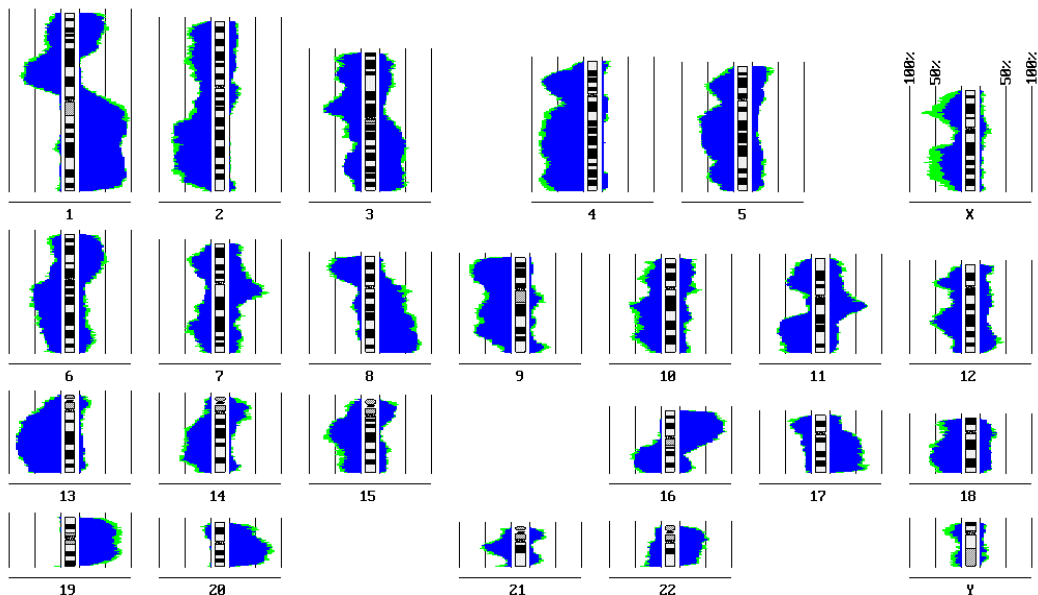


Abbildung 6: CGH-Histogramm der genetischen Alterationen in 30 invasiv duktalem Mammakarzinomen, blau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, grün $\hat{=}$ 95% Signifikanz; die senkrechten Linien links und rechts der Ideogramme entsprechen einer 50%igen Inzidenz (innen) bzw. 100%igen Inzidenz (außen).

Die Ermittlung der genetischen Alterationen aller Tumorfälle bezogen auf die einzelnen Chromosomen erfolgte anhand der jeweiligen Summenkaryogramme der einzelnen Tumorfälle. Hierbei wiesen 86% der Tumoren eine DNA-Überrepräsentierung auf Chromosom 1q auf. In 69% war der gesamte q-Arm überrepräsentiert. Die zweithäufigsten Aberrationen waren auf den Chromosomen 8q, 16p und 20q mit jeweils 53% der Fälle

lokalisiert. Weitere DNA-Gewinne fanden sich auf Chromosom 19p/q (50%), 17q (46%), 6p (33%), 3q (30%) und 11q13 (33%). Hoch amplifizierte Regionen wurden auf den Chromosomen 1q11-25, 8q21.3-qter und 8q23-qter festgestellt.

DNA-Deletionen auf Chromosom 13q wurden in 76% der Fälle festgestellt, in 91% dieser Fälle bestanden gleichzeitig DNA-Zugewinne auf 1q und/oder 8q. In 21/30 Tumorfällen (70%) waren DNA-Verluste auf Chromosom 4 nachweisbar, davon waren in 11 Mammakarzinomfällen sowohl p-Arm als auch q-Arm betroffen, bei 7 Fällen zeigten sich Verluste ausschließlich auf dem q-Arm und bei 3 Fällen auf dem p-Arm. Chromosom 9 wies in 19/30 Mammakarzinomen DNA-Deletionen auf. Weitere DNA-Unterrepräsentierungen zeigten sich, in abnehmender Häufigkeit, auf 5q und 11q (jeweils 56%), 1p (53%), 8p (50%), 2q, 14q und 16q (jeweils 43%), 6q und 15q (jeweils 40%), 21q (36%), 3p (36%), 18q (33%), 10q (27%), 17p (23%), 7p und 22q (jeweils 17%).

3.2. Genetische Alterationen in invasiv lobulären Mammakarzinomen

In Abbildung 7 sind die genetischen Veränderungen in 20 invasiv lobulären Mammakarzinomen dargestellt.

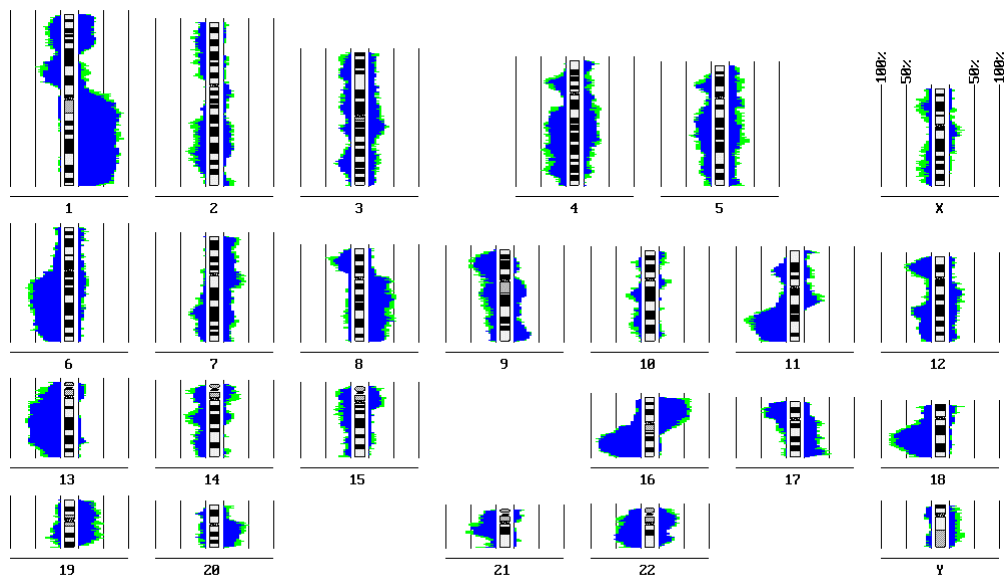


Abbildung 7: CGH-Histogramm über alle genetischen Alterationen in 20 invasiv lobulären Mammakarzinomen, blau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, grün $\hat{=}$ 95% Signifikanz; die senkrechten Linien links und rechts der Ideogramme entsprechen einer 50%igen Inzidenz (innen) bzw. 100%igen Inzidenz (außen).

Die häufigsten DNA-Zugewinne zeigten sich auf Chromosom 1q (60%) sowie 16p (35%). Weiterhin fanden sich DNA-Zugewinne auf 8q und 19p/q (jeweils 30%), 17q (25%) und 11q13 (20%). Hoch-amplifizierte Regionen wurden auf den Regionen 12q14-21 und 20q12-21 detektiert.

Chromosom 16q zeigte in 80% der Fälle eine DNA-Deletion, wobei in 11 Tumoren der gesamte q-Arm betroffen war. Die Region 16q22-23 war immer deletiert. In 65% der Tumoren wurden DNA-Unterrepräsentierungen auf 13q detektiert. Chromosom 11q war in 60% der Fälle vom Verlust betroffen, gefolgt von den Regionen 22q mit einem Anteil von 50% und 6q mit einem Anteil von 45%. Weitere DNA-Deletionen fanden sich, in abnehmender Reihenfolge, auf Chromosom 18q (45%), 17p (40%), 1p (30%), 8p (25%), 21q (20%), 4q und 5q (jeweils 15%).

3.3. Vergleich genetischer Alterationen in invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinom

Alle chromosomalen DNA-Aberrationen in den 30 invasiv duktalem sowie 20 invasiv lobulärem Mammakarzinomen sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Die Anzahl der Alterationen variierte bei den invasiv duktalem Tumoren zwischen 2 und 26 pro Tumorfall (Mittelwert 14,9). Bei den invasiv lobulärem Mammakarzinomen schwankten die Veränderungen zwischen 1 und 19 (Mittelwert 8,9) (Abbildung 8).

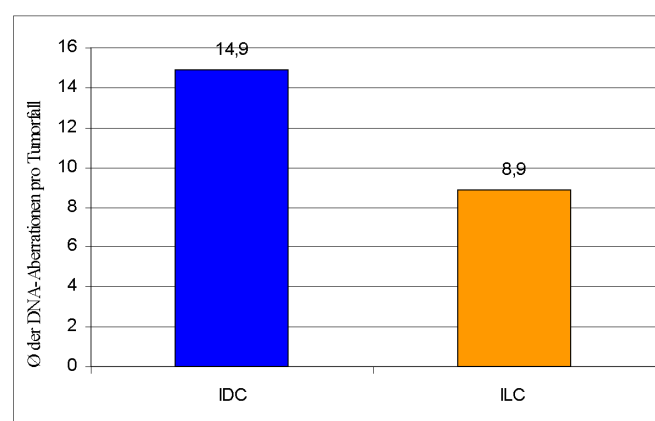


Abbildung 8: Arithmetisches Mittel der DNA-Aberrationen pro Tumorfall in invasiv duktalem (IDC, n=30) und invasiv lobulärem (ILC, n=20) Mammakarzinomen.

Tabelle 3: Genetische Alterationen in invasiv duktalem Mammakarzinomen

Fall-Nr.	DNA-Unterrepräsentierungen	DNA-Überrepräsentierungen	hochamplifizierte Regionen	Anzahl Aberrationen
1	1p21-31, 7q21-qter, 8p21-pter, 9p,q, 12q22-qter, 16q, 17p	1p32-pter, 1q, 8q		n=9
2	13q21-31, 16q			n=2
3	2p,q, 6q, 9p,q, 10p,q, 14q13-qter, 15q11.1-21, 16q, 22q	1q, 7p,q, 16p, 17q, 21q21-qter		n=13
4	1p13-31, 4p,q, 9p,q, 11p, 11q14-23, 12q21-qter, 13q, 14q12-31, 15q, 16q, 21q21	1q, 6p, 16p, 17q, 19p,q, 20p,q		n=16
5	2p12-pter, 2q22-qter, 4p14-15.3, 4q22-qter, 5q13-qter, 6q13-21, 7q21-33, 9p, 21q21, 22q12-qter	1q, 11q12-13, 16p, 18p,q, 20p,q		n=13
6	8p12-pter, 9p,q, 10p,q, 11q14-qter, 13q, 16q21-qter, 22q	1q23-qter, 8q, 16p		n=10
7	1p21-pter, 4q21-qter, 6p,q, 9p,q, 13q13-qter, 16q, 22q	1q, 16p		n=9
8	1p13-22, 4q, 9p,q, 10p,q, 12q21, 16q, 18q12-qter	1q, 8p,q, 16p, 20q12-qter		n=11
9	1p21-32, 4p,q, 6p11.1-21.1, 6q, 7p,q, 8p, 9p, 11p, 11q14-qter, 13q	1q, 5q23-qter, 6p21.2-pter, 8q21.2-qter, 16p,q, 17p,q, 19p,q, 20q, 22q		n=16
10	4q22-qter, 5p,q, 8p12-pter, 9q13-31, 11q14-qter, 13q21-qter, 14q21-24	6p21.1-pter, 19p,q		n=9
11	1p21-p22, 2q22-qter, 4p,q, 5p,q, 6q, 8p, 9q21-32, 10q21-25, 11p12-14, 11q14-23, 12q21, 13q, 14q13-q24, 15q, 18q, 20p, 21q21	1q31-qter, 6p, 7q11.1-11.2, 7q22, 7q32-qter, 8q, 10p, 11q11-13, 17p,q, 19p,q, 20q, 22q	1q11-25	n=26
12	2q23-qter, 3p21-pter, 4p,q, 5q12-23, 6q, 7p14-15, 8p, 11q14-qter, 12q21-22, 13q21-qter, 14q21-qter, 15q15-qter, 18q21-22, 21q21	1p33-pter, 1q, 6p21.2-pter, 17p, 19p,q, 20q, 22q		n=20
13	1p35-pter, 4q23-qter, 16q21-qter, 17p, 18p,q	1q11-23, 3q26.2-qter, 7p12-15, 11q11-13, 13q21-qter, 16p, 17q21-23, 19p,q, 20q, 22q		n=15
14	1p13-31, 2q24-qter, 4p,q, 5q, 8p12-pter, 9p, 11p, 11q14-qter, 12p, 17p	1p33-pter, 1q, 3q12-24, 10q22, 11q12-13, 13q21-31, 16p, 17q21-qter, 20q		n=17
15	1p13-22, 2q13-24, 4p11-15.3, 4q13-28, 5q13-23, 8p, 11q23-qter, 12q21, 13q11-31, 18q21-qter, 21q21	1p31-pter, 1q, 2p15-pter, 3q21-qter, 8q21.3-qter, 10q21-22, 11q12-13, 17q, 19p,q, 20q12-qter, 22q12-qter		n=18
16	1p21-22, 1p34.1-36.1, 2q22-q31, 3p11-14, 3q25-qter, 4p14-pter, 5q14-22, 6q14-22, 8p, 9p,q, 11q14-qter, 13q13-21, 14q24-qter, 15q11.1-21, 17p, 18p	1q3141, 8q21.1-23, 16p, 16q22-qter, 17q22-qter, 18q, 19p, 20q		n=20
17	4q24-qter, 5q14-23, 8p12-pter, 13q21-qter, 15q11.1-13	7p11.1-15, 8q, 17q		n=8
18	1p21-pter, 2q32-qter, 3p, 4q22-28, 4q32-qter, 5p, 5q11.1-13, 7p, 10p,q, 13q	1q22-qter, 3q, 6p, 6q11-16		n=11
19	2p16-pter, 3p, 4q31.3-qter, 6q11-22, 7q22-31, 9q, 11q23-qter, 13q, 15q11.1-21, 16q22-qter, 18p,q, 21q, 22q	1q23-qter, 3q, 5p13-pter, 7q32-qter, 8q21.3-qter, 11q11-22, 12q13-qter, 15q22-qter, 16p, 17q22-qter, 19p,q, 20q		n=22
20	1p13-31, 2q24-qter, 4p14-15.1, 4q21-qter, 5q14-qter, 7q31, 9p12-pter, 11p12-14, 11q21-qter, 13q14-qter, 18q, 20p, 21q21	1q11-23, 6q21-22, 11q13, 12q21-22, 16p, 19p,q, 22q		n=18
21	3p12-14, 4p14-15.3, 4q22-qter, 5q, 8p, 9q31-33, 12q21, 13q, 14q12-qter, 15q, 16q, 17p,q	1q, 3q22-qter, 7p, 8q21.3-qter, 10p, 10q11.1-23, 11q11-13, 12p, 16p, 18p,q, 19p,q, 20q		n=22
22	1p13-31, 2q22-33, 5q14-qter, 8p12-pter, 11q14-qter, 13q13-qter, 18p,q, 21q21	1q, 8q22-qter, 16p, 17q11.1-22, 20q		n=13
23	1p31, 1p35-pter, 2p22-pter, 2q13-qter, 3p12-21, 4p,q, 5q13-qter, 7q, 9q21-qter, 10q21-qter, 12q14-qter, 13q14-qter, 14q13-qter, 15q14-qter, 17p,q	1q, 5p, 6p, 8q, 9p, 12p, 18q12-22		n=20
24	1p13-pter, 2p, 2q11.1-24, 3p11-24, 5q32-qter, 9p21-pter, 10q22-qter, 11q14-qter, 13q, 14q23-qter, 15q11.2-23, 16q, 18p	1q, 3q, 5p, 6q16-qter, 8q, 10p12-pter, 12p12-pter, 14q11.1-22, 16p, 17q, 19q		n=22
25	3p11-pter, 8p, 13q, 16q22-qter	1q, 6p, 8q12-qter, 10p11.1-pter, 14q12-qter, 17q23-qter, 19p,q, 20p,q		n=12
26	3p, 5q12-qter, 6q11.1-21, 7p, 11q14-qter, 13q, 14q, 15q, 21q	1p33-35, 1q, 6p, 8q, 10p, 11q11-13, 12p		n=14
27	3p11-p21, 6q, 14q11.1-23	19q		n=4
28	4p, 9p, 11q21-qter, 13q11-22, 14q24-qter, 16q22-qter, 17p	1q, 6q21-qter, 11p12-14, 11q13-14	8q21.3-qter	n=11
29	1p13-31, 3p12-14, 4p, 5q13-14, 6q11-21, 7q21-31, 8p21-pter, 9p,q, 10q21, 10q23-24, 11q21-qter, 12q21-22, 13q, 14q24-31, 16q, 18p,q, 21q21	1q, 3q13.3-qter, 8q, 20q		n=20
30	1q31, 2q22-qter, 4p, 4q22-qter, 5q13-qter, 6q13-q21, 7p13-21, 8p, 8q11.1-21.1, 11q21-qter, 12q14-23, 13q14-32, 14q21-31, 15q12-22, 18q21-qter, 21q21	1p33-pter, 1q11-25, 1q32-qter, 2p21-pter, 3q22-qter, 6p, 16p, 17p,q, 19p,q, 20q, 22q	8q23-qter	n=24

Tabelle 4: Genetische Alterationen in invasiv lobulären Mammakarzinomen.

Fall-Nr.	DNA-Unterrepräsentierungen	DNA-Überrepräsentierungen	hochamplifizierte Regionen	Anzahl Aberrationen
31	1p21-31, 4q21-22, 6q14-qter, 15q13-qter, 22q	1q, 16p		n=7
32	5q23-31, 13q14-qter, 16q, 17p			n=4
33	1p21-22, 6q14-qter, 11q21-qter, 16q, 22q	1q, 16p		n=7
34	1p34.1-pter, 11p23-pter, 16q, 17p, 18q21-qter, 20p, 22q			n=7
35	2p13-pter, 6q, 16q, 18q	1q, 7p,q		n=6
36	11q21-qter, 13q11-13, 15q21, 16q, 17p, 18p,q, 22q	1q, 16p, 17q		n=10
37	5q22-23, 9p21-pter, 13q21-32, 14q13-21, 16q22-qter, 21q21	1p34.3-pter, 19q		n=8
38	11q13-qter, 16q, 22q	1q22-qter		n=4
39	5q12-21, 6q16-qter, 8p12-pter, 11q14-qter, 12p12-pter, 13q11-21, 16q, 17p, 18q11.1-21, 22q	1q22-32, 8q, 16p		n=13
40	2p21-pter, 6q, 10q23-25, 11q22-qter, 12p, 13q, 14q23-qter, 16q, 17p, 18q21-qter, 22q	8q, 17q21-qter		n=13
41	2q34-36, 11q21-24, 12q24.1-qter, 13q11-21, 16q, 22q11.1-12	1q, 2q24-32, 8p,q, 11p11.2-14, 11q13-14		n=9
42	6p,q, 12p,q, 13q, 14q12-qter, 16q, 17p, 18p,q, 21q	1q, 5p,q, 7p,q, 11q11-13, 16p, 17q, 19p, 20q		n=16
43	8p,q, 12p12-pter, 12q21-22, 13q21-31, 16q13-23, 22q	1q, 6p,q, 16p		n=8
44	1p21-31, 4q27-qter, 6q14-qter, 7q21-qter, 8p12-pter, 9p13-pter, 10q21-qter, 11p11.2-14, 11q14-qter, 12q15-qter, 13q21-32, 14q21, 15q15-21, 16q, 18q12-qter, 21q21	1p32-pter, 1q, 8q, 16p, 18p		n=19
45	9q21-33, 11p12-14, 11q21-23, 13q13-qter	11q13		n=4
46	4q, 6p11.1-21.1, 6q, 7q31-qter, 11p11.1-14, 11q21-qter, 13q, 18q12-qter, 21q21	1p33-pter, 17p,q, 19p,q, 20q, 22q		n=12
47	16q21-qter			n=1
48	8p12-22, 12p, 16q21-qter, 17p, 18q12-qter, 22q12-qter	1q		n=7
49	1p13-pter, 6q13-qter, 7q21-qter, 8p12-pter, 11q22-qter, 12q23, 13q21-qter, 16q21-qter	1q, 7p, 8q, 11q13-14, 19p,q		n=12
50	1p34.2-pter, 3p13-pter, 11q14-qter, 13q11-q21, 14q24-qter, 17p, 19q13.2-qter, 21p	1p21-31, 8q21.2-qter, 14q12-22	12q14-21, 20q12-qter	n=11

In invasiv duktalem Mammakarzinomen läßt sich neben einer größeren Anzahl an genetischen Veränderungen pro Tumorfall auch eine größere Anzahl von DNA-Gewinnen zu DNA-Verlusten gegenüber invasiv lobulären Tumoren erkennen (Abbildung 9). In den 30 invasiv duktalem Tumoren wurden insgesamt 476 genetische Aberrationen mit einem Anteil von 187 DNA-Überrepräsentierungen und 289 DNA-Deletionen registriert. Die 20 invasiv lobulären Mammakarzinome zeigten insgesamt 187 Aberrationen, welche sich aus 53 DNA-Überrepräsentierungen und 134 DNA-Deletionen zusammensetzten.

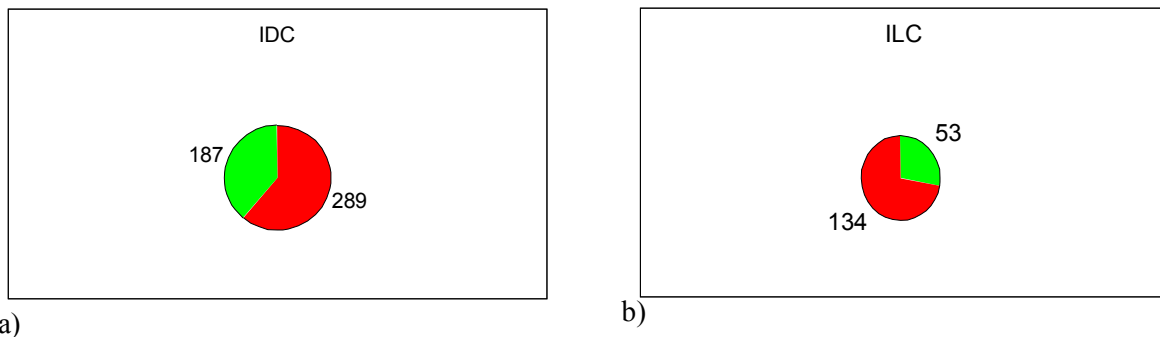


Abbildung 9: Anzahl der DNA-Gewinne und DNA-Verluste in a) invasiv duktalem (IDC, n=30) und b) invasiv lobulären (ILC, n=20) Mammakarzinomen.

In invasiv duktalem Mammakarzinomen wurden 6,2 DNA-Gewinne und 9,6 DNA-Verluste pro Tumorfall festgestellt, im Vergleich zu 2,7 DNA-Gewinnen und 6,7 DNA-Verlusten pro Tumorfall in invasiv lobulären Tumoren (Abbildung 10).

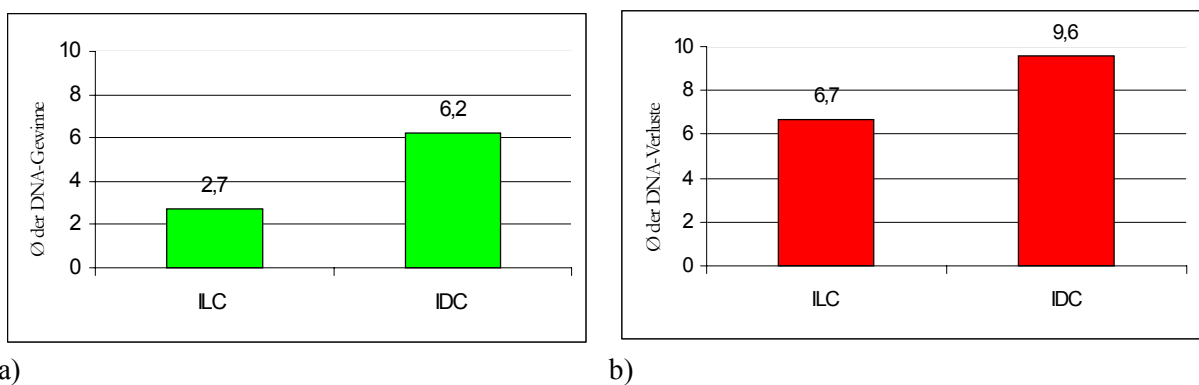


Abbildung 10: a) DNA-Gewinne und b) DNA-Verluste pro Tumorfall in invasiv duktalem (IDC, n=30) und invasiv lobulären (ILC, n=20) Mammakarzinomen.

Die Abbildung 11 zeigt ein sogenanntes Differenzhistogramm, in dem alle genetischen DNA-Alterationen, die in den invasiv duktalem und invasiv lobulären Mammakarzinomen von uns

gefunden wurden, dargestellt sind. “Rot” repräsentiert dabei den Überschuß der DNA-Aberrationen in invasiv duktalem Mammakarzinomen und “grün” den der invasiv lobulären Mammakarzinome.

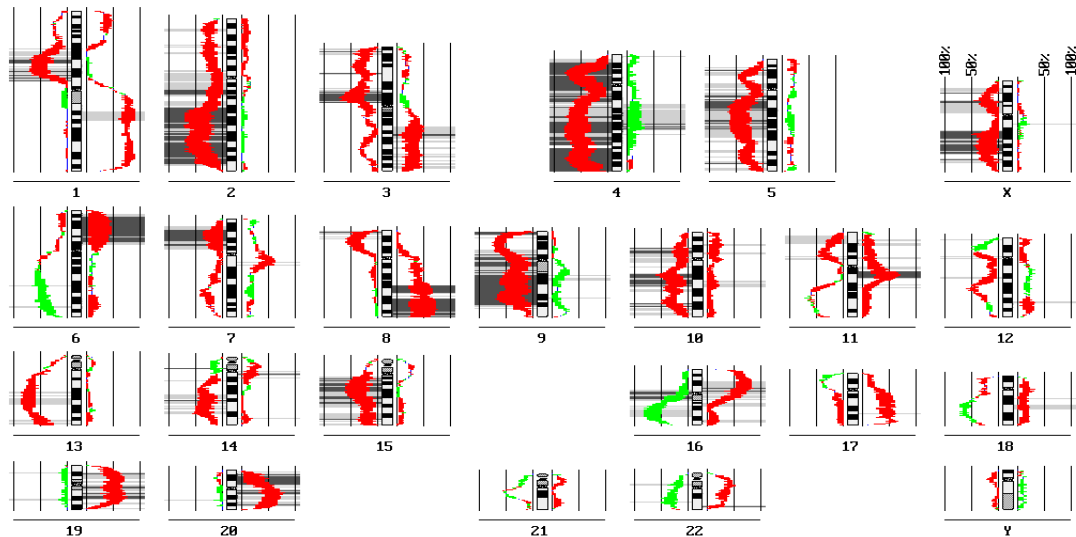


Abbildung 11: Differenzhistogramm von 30 invasiv duktalem (IDC) und 20 invasiv lobulären (ILC) Mammakarzinomen. (rot $\hat{=}$ Überschuß der chromosomalen Imbalancen in IDC, grün $\hat{=}$ Überschuß der chromosomalen Imbalancen in ILC; weiße Areale zwischen farbigen Anteilen und dem Chromosomenideogramm $\hat{=}$ Anteil der gemeinsamen Veränderungen von IDC und ILC; grau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, hellgrau $\hat{=}$ 95% Signifikanz. Die senkrechten Linien links und rechts der Ideogramme entsprechen einer 50%igen Inzidenz (innen) bzw. 100%igen Inzidenz (außen).

Die Bereiche mit grauer bzw. hellgrauer Schraffierung kennzeichnen diejenigen chromosomalen Veränderungen, die mit einer Signifikanz von 99% bzw. 95% zwischen den invasiv duktalem und invasiv lobulären Mammakarzinomen different waren (Chi-Quadrattest). In invasiv duktalem Mammakarzinomen fanden sich häufiger DNA-Deletionen auf 1p, 2q, 3p, 4p/q, 5q, 7p, 8p, 9q und 10q. DNA-Gewinne traten im Vergleich zu invasiv lobulären Tumoren häufiger auf den Chromosomen 6p, 8q, 11q13, 16p, 17q, 19p/q und 20q auf. In invasiv lobulären Mammakarzinomen waren hauptsächlich die DNA-Unterrepräsentierungen auf 6q, 16q, 17p, 18q und 22q zu finden. Die Abbildung 12 zeigt noch einmal die unterschiedliche Häufigkeit der Aberrationen in invasiv duktalem und invasiv lobulären Mammakarzinomen in Bezug auf einzelne Chromosomen:

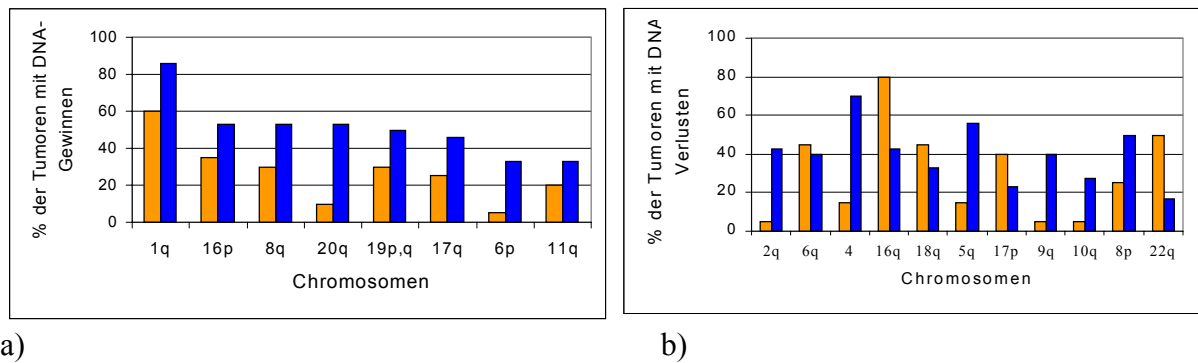


Abbildung 12: Chromosomale Verteilung von a) DNA-Gewinnen und b) DNA-Verlusten in 30 invasiv duktalem (blau) und 20 invasiv lobulären (orange) Mammakarzinomen.

3.4. Genetische Alterationen in gut und schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinomen

Neun invasiv duktales Mammakarzinome mit guter histologischer Differenzierung (G1) und einundzwanzig invasiv duktales Mammakarzinome mit schlechter Differenzierung (G3) wurden untersucht. Anhand eines Differenzhistogramms konnten die signifikanten Unterschiede bei den genetischen Alterationen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades aufgezeigt werden. Die gut differenzierten Tumore wiesen im Mittel 10,55 genetische Veränderungen auf, während schlecht differenzierte Karzinome im Mittel 17,24 Alterationen zeigten. In gut und schlecht differenzierten Tumoren traten DNA-Gewinne in $\geq 50\%$ der Tumorfälle auf 1q, 11q11-13, 16p, 19 und 20q sowie DNA-Deletionen in $\geq 50\%$ im Bereich der Chromosomen 4 und 13q auf. DNA-Verluste auf 5q, 18q und 21q waren mit einem geringen Differenzierungsgrad assoziiert. Die Abbildung 13 zeigt die Differenzhistogramme der Chromosomen 5 und 21. Alterationen in den G3-Tumoren sind durch rote Flächen und in G1-Tumoren durch grüne Flächen dargestellt, die grauen Bereiche kennzeichnen die Unterschiede beider Gruppen mit 99% Signifikanz.



Abbildung 13: Differenzhistogramme der Chromosomen 5 (a) und 21 (b) bei gut (G1) und schlecht (G3) differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinomen, grün $\hat{=}$ Überschuß der chromosomalen Imbalancen in G1-Karzinomen, rot $\hat{=}$ Überschuß der chromosomalen Imbalancen in G3-Karzinomen; weiße Areale zwischen farbigen Anteilen und der 0%-Inzidenzlinie $\hat{=}$ Anteil der gemeinsamen Veränderungen in G1- und G3-Karzinomen; grau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, hellgrau $\hat{=}$ 95% Signifikanz.

3.5. Vergleich von Östrogenrezeptor-positiven und -negativen invasiv duktalem Mammakarzinomen

Für die Untersuchung chromosomaler Alterationen in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus wurde ebenfalls ein Differenzhistogramm erstellt, wobei acht invasiv duktalem Mammakarzinome mit negativem Östrogenrezeptorgehalt und einundzwanzig mit positivem Östrogenrezeptorgehalt ausgewertet wurden (Abbildung 14). Die Karzinome mit negativem Rezeptorstatus werden durch die roten Bereiche und die Karzinome mit positivem Rezeptorstatus durch grüne Flächen gekennzeichnet (Unterschiede der genetischen Alterationen mit 99%iger bzw. 95%iger Signifikanz durch graue bzw. hellgraue Areale markiert).

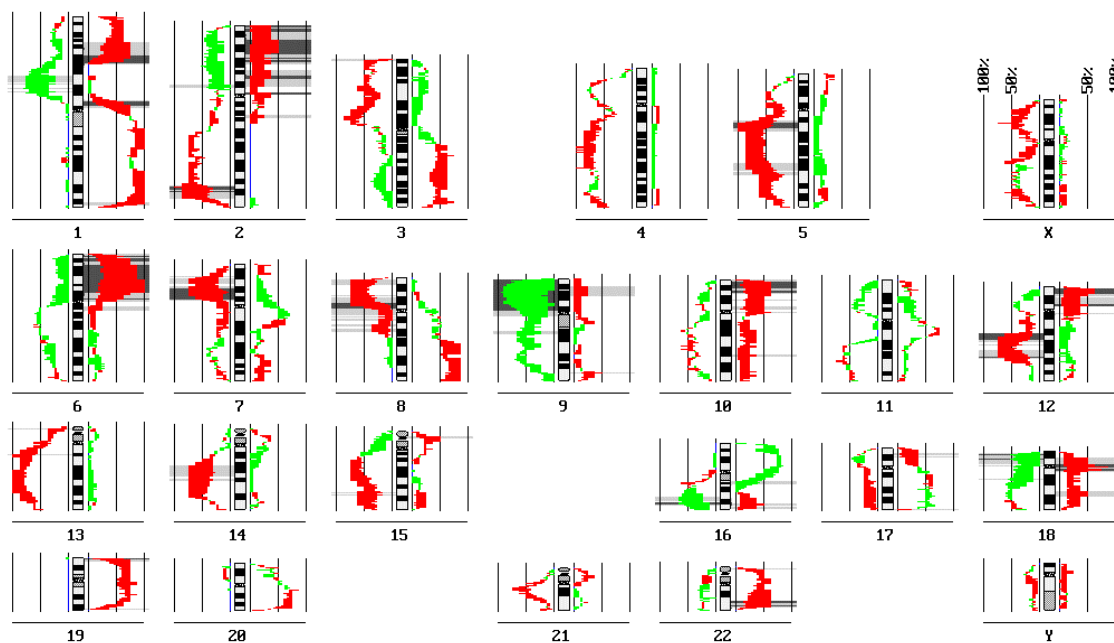


Abbildung 14: Differenzhistogramm zwischen 21 Östrogenrezeptor-positiven (ER+) und 8 Östrogenrezeptor-negativen (ER-) invasiv duktalem Mammakarzinomen; grün $\hat{=}$ Überschuss der chromosomalen Imbalancen in ER+, rot $\hat{=}$ Überschuss der chromosomalen Imbalancen in ER-; weiße Areale zwischen farbigen Anteilen und dem Chromosomenideogramm $\hat{=}$ Anteil der gemeinsamen Veränderungen in ER+ und ER-; grau $\hat{=}$ 99% Signifikanz der genetischen Alterationen, hellgrau $\hat{=}$ 95% Signifikanz; die senkrechten Linien links und rechts der Ideogramme entsprechen einer 50%igen Inzidenz (innen) bzw. 100%igen Inzidenz (außen).

Die Östrogenrezeptor-negativen invasiv duktalem Tumore zeigten insgesamt eine größere Anzahl an genetische Alterationen als Östrogenrezeptor-positive, hierbei fanden sich häufiger DNA-Zugewinne in $\geq 50\%$ der Fälle im Bereich der Chromosomen 1p, 6p und 22q, DNA-Verluste wurden vermehrt auf 5q, 7p, 8p und 12q detektiert. In beiden Gruppen traten DNA-Überrepräsentierungen in $\geq 50\%$ der Fälle auf 1q, 8q, 11q13, 16p, 19 und 20q, DNA-Deletionen in mehr als der Hälfte der Tumoren auf 2q und 4p/q auf.

4. Diskussion

Obwohl die molekularen Grundlagen der Prozesse, die zur Malignität der Mammakarzinome führen, vielfach noch unbekannt sind, gibt es heute keinen Zweifel mehr am Konzept einer genetischen Basis des Brustkrebses. Die komparative genomische Hybridisierung erlaubt mit einem Experiment eine umfassende Genomanalyse eines Tumors (Kallioniemi et al., 1992). Die detektierbaren genetischen Veränderungen werden entweder als DNA-Gewinne oder -Verluste klassifiziert, welche Hinweise auf eine Onkogenaktivierung oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen geben können. Die bisher an invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinomen durchgeführten CGH-Studien lassen erkennen, daß weniger einzelne chromosomale Veränderungen als vielmehr ein komplexes Muster an Aberrationen die Malignität dieser Tumoren und damit die Prognose bestimmen (Kallioniemi et al., 1994a; Isola et al., 1995; Ried et al., 1995; Aldaz et al., 1995; Nishizaki et al., 1997a, Nishizaki et al., 1997b; Courjal und Theillet, 1997; Schwendel et al., 1998a; Schwendel et al., 1998b, Tirkkonen et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels CGH die genetischen Veränderungen in 30 invasiv duktalem und 20 invasiv lobulärem Mammakarzinomen untersucht. Generell waren in beiden Tumorarten DNA-Verluste häufiger als DNA-Gewinne anzutreffen und auch Nishizaki und Mitarbeiter (1997b) kamen diesbezüglich zu den selben Ergebnissen. Sowohl die von uns untersuchten invasiv duktalem als auch die invasiv lobulären Mammakarzinome zeigten DNA-Verluste in $\geq 40\%$ der Fälle im Bereich der Chromosomen 6q, 11q22-qter und 13q. DNA-Deletionen auf 18q konnten mit einer Häufigkeit von mindestens 45 % bei allen untersuchten invasiv lobulären und allen schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinomen nachgewiesen werden. DNA-Überrepräsentierungen auf 1q wiesen beide Tumorarten in mehr als der Hälfte der Fälle auf. Sie wurden entweder als Resultat einer sog. Isochromosomenbildung oder als Folge einer unbalanzierten Translokation $t(1;16)(q10;p10)$ gesehen (Dutrillaux et al., 1990). DNA-Zugewinne in dieser Region waren nach unseren Untersuchungen in den invasiv duktalem Mammakarzinomen unabhängig vom Differenzierungsgrad. In phylloiden Brusttumoren wurden 1q-Zugewinne auch häufig bei gut differenzierten Wachstumsmustern nachgewiesen (Polito et al., 1998), so daß diese Alteration vermutlich ein frühes Ereignis in der Tumorgenese der Mammakarzinome darstellt.

Die häufig deletierte Region 11q22-qter wurde in 45% der invasiv lobulären Tumoren und in 50% der invasiv duktalem Tumoren festgestellt. DNA-Deletionen zwischen 11q22-23 wurden bereits früher bei einer großen Anzahl von Brustkarzinomen beschrieben (Hampton et al., 1994; Carter et al., 1994). Auch bei malignen Melanomen (Herbst et al., 1995), Zervixkarzinomen (Bethwaite et al., 1995), Magenkarzinomen (Baffa et al., 1996) und Blasenkarzinomen (Shaw und Knowles, 1995) wurde eine DNA-Deletion dieser Region festgestellt. Das deutet darauf hin, daß auf 11q22-23 ein Tumorsuppressorgen lokalisiert ist, das in der Kanzerogenese vieler Tumorentitäten eine Rolle spielt. Möglicherweise korreliert diese DNA-Deletion mit einem aggressivem, postmetastatischem Verlauf (Winqvist et al., 1995). Koreth et al. (1997) beschrieben einen Heterozygotieverlust (LOH) der Regionen 11q22-23.1 und 11q25 mit einer Häufigkeit von 63% bzw. 51%. Die Autoren verbinden die DNA-Unterrepräsentierung auf 11q22-23 mit der Suppression des Ataxie-Teleangiektasie Gens (ATM), welches in der proximalen Region kartiert worden ist. Untersuchungen ergaben ein etwa fünffach höheres Brustkrebsrisiko bei Frauen, welche einen Heterozygotieverlust des ATM-Gens aufwiesen (Swift et al., 1991). Auf 11q25 wurde bislang noch kein Tumorsuppressorgen beschrieben.

Tirkkonen und Mitarbeiter (1998) fanden bei invasiv duktalem Brustkrebstumoren einen Zusammenhang zwischen DNA-Verlusten auf 13q und DNA-Zugewinnen auf 1q und/oder 8q. Auch in unserem Fall trat die Kombination von 13q-Verlusten mit zusätzlichen DNA-Alterationen auf 1q und 8q hauptsächlich bei invasiv duktalem Tumoren (70%) auf und nur bei 40% der invasiv lobulären Tumoren. Möglicherweise liegt hier eine Isochromosomenbildung vor, und diese manifestiert sich in höherer Frequenz bei invasiv duktalem Mammakarzinomen. Hamann et al. (1996) fanden bei 78 sporadischen Brusttumoren Allel-Imbalancen auf 13q12-14 korreliert mit kleiner Tumorgroße und sehen diese Alteration als ein frühes Ereignis der Tumorgenese. Die Gene RB1 (13q14) und BRCA2 (13q12-13) sind als mögliche betroffene Tumorsuppressorgene lokalisiert worden. Während das BRCA2 Gen als Brustkrebs-disponierendes Gen identifiziert worden ist (Wooster et al., 1994), wird noch kontrovers diskutiert, welche Rolle das RB1-Gen bei Brusttumoren spielt. Borg et al. (1992) sahen bei Brusttumoren keine Korrelation zwischen einem Allelverlust des RB1-Gens und einer verminderten Proteinexpression. In den von uns untersuchten Tumorproben waren neben Verlusten des gesamten 13q-Arms auch häufig Regionen unterhalb von 13q14 deletiert, so daß hier möglicherweise zusätzliche bisher nicht identifizierte Tumorsuppressorgene existieren.

DNA-Verluste auf 18q wurden von Cropp und Mitarbeitern (1990) als signifikanter Indikator für die Progredienz von Brustkrebs angesehen. Als mögliches Tumorsuppressorgen kommt das DCC-Gen in Frage, welches in der Region 18q21.1-21.3 lokalisiert ist (Yokota et al., 1997). Die von uns häufig detektierten Verluste auf 18q in Mammakarzinomen mit schlechter Differenzierung stimmen gut mit den Ergebnissen von Tsuda et al. (1998) überein. Aus unseren Resultaten geht weiterhin hervor, daß DNA-Verluste auf 18q charakteristisch für lobuläre Mammakarzinome sind und sich hier möglicherweise schon in früheren Stadien manifestieren.

Verschiedene Studien an Mammakarzinomen zeigten, daß DNA-Deletionen auf Chromosom 6q zu den am häufigsten gefundenen Veränderungen gehören (Dutrillaux et al., 1990; Devilee et al., 1991). Laut unseren Ergebnissen läßt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens an DNA-Deletionen auf 6q und dem histologischen Typ feststellen. Es besteht auch kein Zusammenhang zwischen Verlusten auf 6q, dem Differenzierungsgrad und der Tumorgröße. Studien zeigten, daß schon bei DCIS-Tumoren als auch bei frühinvasiven Mammakarzinomen sehr häufig Allelverluste auf 6q auftreten, so daß sich auch diese DNA-Alteration früh zu manifestieren scheint (Chappell et al., 1997, Kuukasjarvi et al., 1997).

4.1. Invasiv duktale Mammakarzinome

DNA-Gewinne

Die Zahl der DNA-Überrepräsentierungen pro Tumorfall war in invasiv duktalem Mammakarzinomen deutlich höher als in invasiv lobulären Tumoren. Im einzelnen zeigten sich häufig DNA-Gewinne auf den Chromosomen 6p, 8q, 11q11-13, 16p, 17q, 19 und 20q. DNA-Zugewinne und die damit zusammenhängende Überexpression von Onkogenen sind häufig beobachtete Phänomene in Brusttumoren (Van de Vijver 1993; Bieche und Liederan, 1995), die zur Tumorprogression beitragen (Brison 1993).

Seit über zehn Jahren werden Amplifikationen des c-myc Gens (8q24) mit der Tumorprogression von Brustkrebs in Verbindung gebracht (Leder et al., 1986). Das c-myc-Protein hat einen Einfluß auf die Regulation der Genexpression, fördert die Zellproliferation und übt einen negativen Effekt auf die Differenzierung aus (Jones 1990; Prendergast et al., 1991; Meichle et al., 1992). Außerdem bindet das c-myc-Protein an das RB1-Protein und kann dieses somit inaktivieren (Rusty et al., 1991). Das c-myc Onkogen wird daher mit

aggressivem Wachstum (Ried et al., 1995) und schlechter Prognose (Isola et al., 1995) assoziiert. DNA-Gewinne auf 8q werden häufig in Tumoren beobachtet, die auch eine große Anzahl weiterer DNA-Alterationen aufweisen (Tirkkonen et al., 1998). Dies kann anhand unserer Ergebnisse bestätigt werden, da 10 von 16 invasiv duktales Mamma-Tumore fünfzehn oder mehr Alterationen zeigten, in zwei Tumorfällen wurden hochamplifizierte Regionen auf 8q21.3-qter und 8q23-qter festgestellt. Das häufigere Auftreten von 8q-Gewinnen in den untersuchten invasiv duktales Tumoren im Vergleich zu invasiv lobulären, läßt auch hier eine Assoziation mit dem duktales Wachstumsmuster vermuten.

DNA-Gewinne der Region 11q13 werden in 15-20% der Brusttumoren beschrieben (Lammie und Peters, 1991; Gaudray et al., 1992), gleichzeitig besteht regelmäßig eine Überexpression des Genprodukts (Lammie et al., 1991; Gillet et al., 1994). Ob es neben einer Gen-Amplifikation noch andere Mechanismen für eine Protein-Überexpression gibt, ist allerdings noch nicht geklärt (Hui et al., 1998). Auf der amplifizierten Region 11q13 sind die Gene Cyclin D1 sowie EMS1 als Kandidaten-Onkogene bekannt. Das Cyclin D1-Gen ist an der Regulation der G1-Phase und am Übertritt der G1 in die S-Phase beteiligt ist (Sherr 1993), während das EMS1-Gen für ein Aktin-bindendes Protein des Zytoskellets kodiert (Wu et al., 1991). Somit übt das Cyclin D1-Gen vermutlich einen positiven Effekt auf die Zellproliferation aus (Resnitzky et al., 1994). Anhand unserer Ergebnisse ließ sich in invasiv duktales Mammakarzinomen keine Beziehung zwischen 11q13-Amplifikationen und dem Differenzierungsgrad feststellen. Die von Courjal und Mitarbeitern (1996) gefundenen vermehrten 11q13-Amplifikationen in invasiv lobulären Mammakarzinomen sowie in Fällen von Duktalem Carcinoma in situ (DCIS) sprechen diesbezüglich für ein frühes Auftreten dieser Alteration.

46% der invasiv duktales Mammakarzinome wiesen in unserem Fall DNA-Gewinne auf 17q auf. Ein Proto-Onkogen, welches einen Einfluß auf die Prognose des Mammakarzinoms ausübt, ist das c-erbB-2 Gen (17q12) (Slamon et al., 1987, Fukushige et al., 1986). Das Gen ist in durchschnittlich 20% der invasiv duktales Mammakarzinome überexprimiert (Gusterson et al., 1988; Murphy et al., 1995). Es kodiert für ein Transmembranprotein aus der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Das Protein besitzt eine Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (Di Fiore et al., 1987; Slamon et al., 1987) und verschiedene Untersuchungen ergaben, daß es eine wichtige Rolle in der Zellmotilität und in der Ausdehnung von Tumorzellen im Verlauf der Metastasierung spielt (De Corte et al., 1994; Yu und Hung, 1991).

Wir beobachteten vermehrte DNA-Zugewinne auf Chromosom 20q13 in invasiv duktalem Mammakarzinomen gegenüber invasiv lobulären Tumoren, was mit den Ergebnissen von Nishizaki et al. (1997b) korreliert. Diese Alteration wurde in früheren Studien mit einer schlechteren Prognose bei Brusttumoren verbunden (Isola et al., 1995; Ried et al., 1995). Durch Anzick et al. (1997) wurde das AIB1-Gen als mögliches Kandidatengen identifiziert.

DNA-Verluste

In $\geq 50\%$ der Fälle zeigten die invasiv duktalem Mammakarzinome DNA-Deletionen der Chromosomen 1p, 4, 5q, 8p und 9. Weitere häufige DNA-Verluste fanden sich im Bereich von 2q, 3p, 7p und 10q.

Regelmäßige Verluste auf 4q in invasiv duktalem Tumoren der Brust wurden erstmals durch uns (Schwendel et al., 1998a) beschrieben. Tanner et al. (1998) fanden bei Mammakarzinomen einen vermehrten Verlust auf 4q assoziiert mit prognostisch ungünstigem hypodiploiden DNA-Gehalt. Der regelmäßige DNA-Verlust auf 4q in invasiv duktalem Tumoren läßt einen größeren Einfluß von hier lokalisierten Tumorsuppressorgenen vermuten, die Identifizierung möglicher Kandidatengene steht jedoch noch aus.

Die Häufigkeit der von uns beobachteten DNA-Verluste auf 9q in invasiv duktalem Tumoren korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren (Devilee et al., 1991; Nishizaki et al., 1997a). In der vorliegenden Arbeit ergab sich als kleinste gemeinsame Region 9q31-q33. DNA-Verluste auf Chromosom 9q wurden mit einer Frequenz von 67% in Blasenkarzinomen beschrieben (Tsai et al., 1990). Kürzlich wurde neben dem DBC1-Gen als mögliches Tumorsuppressorgen ein neues Gen, das DBCCR1-Gen als Kandidatengen für die Region 9q32-q33 in Blasenkarzinomen identifiziert (Habuchi et al., 1998). Inwieweit diese Gene auch in der Genese von Brustkrebs beteiligt sind oder ob andere noch nicht bekannte Tumorsuppressorgene involviert sind, ist noch unklar. Bei 9p21 befindet sich das p16-Tumorsuppressorgen, dessen Genprodukt in über 50% der Brustkarzinome fehlt oder vermindert ist (Geradts et al., 1995). Das Protein ist bekannt als ein negativer Regulator im Retinoblastom-Zellzyklus (Serrano et al., 1993). Es verhindert die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des Retinoblastom-Gens (RB) (Weinberg 1995), wodurch der Übertritt der Zellen von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus unterdrückt wird (Hall und Peters, 1996). In Tumoren mit hoher RB-Expression wurde eine geringe p16-Expression gefunden, welches zu der Annahme einer inversen Proteinexpression führte (Geradts et al., 1995). In kleinzelligen Bronchialkarzinomen ist die verminderte p16-Expression mit einem

signifikant schlechteren Verlauf assoziiert (Kratzke et al., 1996). Bei Mammakarzinomen wurde allerdings kürzlich von Dublin und Mitarbeitern (1998) eine ungünstige Prognose korreliert mit einer erhöhten p-16-Expression, so daß die Rolle des p16-Proteins als alleiniger prognostischer Faktor bei Brusttumoren noch unklar ist.

Die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit detektierten DNA-Verluste auf Chromosom 8p korreliert mit den Ergebnissen aus LOH-Studien, in denen Allelverluste in mehr als 50% (Kerangoueven et al., 1995; Imbert et al., 1996) bzw. in 60% (Anbazhagan et al., 1998) der Mammakarzinome auftraten. Ein geringerer Anteil an 8p-Deletionen (29%) wurde von Tirkkonen et al. (1998) mittels CGH detektiert. Allelverluste auf 8p wurden u.a. vermehrt in fortgeschrittenen Prostata- (Suzuki et al., 1995), Dickdarm- (Tanaka et al., 1996) und Blasen-Karzinomen (Knowles et al., 1993) beschrieben. Yaremko et al. (1996) stellten einen vermehrten 8p-Verlust bei Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinomen im Vergleich zum duktalem Carcinoma in situ fest. Möglicherweise trägt diese DNA-Alteration über eine vermehrte Invasivität zur Tumorprogression bei.

Auf 10q23 wurde das PTEN/MMAC1-Gen identifiziert (Steck et al., 1997), welches sowohl bei familiär vererbtem als auch bei sporadischem Brustkrebs mutiert ist (Rhei et al., 1997). Bei allen acht detektierten 10q-Deletionen in unserer Arbeit war die Region 10q23 involviert, in der Hälfte der Tumorfälle war der gesamte q-Arm betroffen. DNA-Deletionen auf 10q wurden ebenfalls mit großer Frequenz in anderen Tumorarten gefunden, beispielsweise in kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Petersen et al., 1997), malignen Meningeomen (Rempel et al., 1993), Glioblastomen (Teng et al., 1997) und Melanomen (Isshiki et al., 1993). Als Tumorsuppressorgen in Prostatakarzinomen wurde das Mxi1-Gen (10q24-q25) identifiziert (Eagle et al., 1995). Das Mxi1-Protein wirkt als ein Antagonist des c-myc-Proteins (Schreiber-Agus et al., 1998). Dies korreliert mit unseren Ergebnissen insofern, daß in sechs von acht Mammakarzinomen die 10q-Deletion mit einer DNA-Überrepräsentierung der Region 8q24 verbunden war. Das Mxi1-Gen ist möglicherweise auch ein Tumorsuppressorgen-Kandidat in Brusttumoren.

DNA-Verluste auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 wurden in Brustkrebstumoren durch cytogenetische Studien und mittels LOH nachgewiesen (Sato et al., 1991; Chen et al., 1994; Pandis et al., 1993). Neben dem auf 3p25-26 lokalisierten von-Hippel-Lindau Gen (Sekido et al., 1994) ist das FHIT-Gen auf 3p14.2 (Sozzi et al., 1996) identifiziert worden. Dieses Gen befindet sich in einer sog. fragile site des Genoms. Hierbei handelt es sich um Regionen, auf

denen leicht Chromosomenbrüche auftreten durch die Einwirkung von Karzinogenen. Bei den von uns gefundenen DNA-Unterrepräsentierungen auf 3p war die Region 3p14 als kleinste überlappende Region mit involviert. DNA-Deletionen auf 3p14 verbunden mit einem veränderten FHIT-Genprodukt wurden bereits von Pandis et al. (1997) sowohl in Brustkarzinomen als auch in Fibroadenomen detektiert. Als Haupteffekt der gestörten Genexpression liegt möglicherweise primär eine gesteigerte Zellproliferation vor. Ein Tumorfall zeigte bei dem nicht überlappenden Abschnitt 3p21-pter einen DNA-Verlust, hier werden zusätzliche Tumorsuppressorgene vermutet (Sekido et al., 1998).

4.1.1. Genetische Alterationen in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades

Die in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Ergebnisse deuten daraufhin, daß Tumoren mit identischem Differenzierungsgrad durch ein ähnliches Muster an genetischen Alterationen gekennzeichnet sind. Die schlecht differenzierten invasiv duktales Mammakarzinome (G3) wiesen darüberhinaus eine größere Anzahl und zusätzliche chromosomale Alterationen gegenüber Tumoren mit gutem Differenzierungsgrad (G1) auf. DNA-Gewinne auf 1q, 11q11-13, 16p und 20q und DNA-Deletionen auf Chromosom 4 und 13q wurden sowohl in gut als auch schlecht differenzierten Tumoren nachgewiesen, so daß diese Alterationen möglicherweise frühe Ereignisse in der Tumorgenese darstellen.

In den von uns untersuchten Mammakarzinomen wurde eine neue Region auf 5q detektiert, die überwiegend in invasiv duktales Tumoren mit schlechter Differenzierung auftrat. Im Bereich der häufig involvierten Region 5q13-23 sind u.a. die Tumorsuppressorgene MCC und APC lokalisiert. Beide spielen in der Entstehung gastrointestinaler Tumoren eine wichtige Rolle (Kinzler et al., 1991; Groden et al., 1991) und auch beim Adenokarzinom des Magens tritt der 5q-Verlust vornehmlich in fortgeschrittenen Tumorstadien auf (Nishizuka et al., 1998).

In den hier untersuchten Tumorfällen war ein DNA-Verlust der Region 21q21 charakteristisch für schlecht differenzierte Tumore. Mittels CGH konnten auch in wenig differenzierten squammösen Kopf/Hals Karzinomen 21q-Deletionen beobachtet werden (Bockmühl et al., 1998). Unsere Ergebnisse sowie Studien von Ohgaki und Mitarbeitern (1998) deuten darauf hin, daß auf 21q21 als kleinste überlappende Region mögliche Tumorsuppressorgene lokalisiert sind.

4.1.2. Genetische Alterationen in Abhängigkeit des Östrogenrezeptor-Status

Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome wiesen eine geringere Anzahl chromosomaler Alterationen auf als Östrogenrezeptor-negative Tumore. DNA-Gewinne, die bisher nicht mit erhöhter Frequenz in Östrogenrezeptor-negativen Tumoren beobachtet wurden, fanden sich in unserem Fall im Bereich von 1p, 6p und 22q, DNA-Deletionen wurden vermehrt auf 5q, 7p, 8p und 12q detektiert.

Als prognostisch signifikante Marker beim Mammakarzinom werden seit längerem die Steroidrezeptoren angesehen (Coagner 1991; Yeatman und Bland 1991). Deren Anwesenheit verbessert den Erfolg einer antihormonalen Therapie und damit die Prognose. Eine 1998 von der internationalen Gruppe der „Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group“ publizierte Metaanalyse von adjuvanten Tamoxifen-Studien hat gezeigt, daß der Einsatz des Antiöstrogens Tamoxifen besonders bei postmenopausalen Frauen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren gegenüber den nichtbehandelten Frauen das Risiko eines Rückfalls um 50% reduziert. Durch Jeng et al. (1998) wird allerdings das Phänomen beschrieben, daß östrogenabhängige Brusttumorzellen durch primären Östrogenentzug und eine sekundäre antiöstrogene Therapie zunächst in der Proliferation gehemmt werden, nach jeweils durchschnittlich 12-18 Monaten jedoch wieder ein gesteigertes Wachstum aufweisen. Dies wird neben einer vermehrten Östrogenrezeptor-Expression auf die Aktivierung von östrogenabhängigen Target-Genen, wie z.B. das c-myc Gen, zurückgeführt. Andererseits erwies sich, daß auch eine Östrogenstimulation zur vermehrten Cyclin D1- (Altucci et al., 1996; Prall et al., 1997) und c-myc-Expression (Jeng et al., 1998) führt.

In Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen wird eine Assoziation zwischen dem negativen Rezeptorstatus und der Mutation prognostisch ungünstiger Gene beschrieben, wie insbesondere Alterationen des p53 Gens (Isola et al., 1992) und des c-erbB-2 Gens (Paik et al., 1998). Anhand des vorliegenden Differenzhistogramms konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptor-Status und den beschriebenen p53- oder c-erbB-2-Alterationen festgestellt werden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß in invasiv duktalem Mammakarzinomen mit negativem Östrogenrezeptorstatus eine vermehrte DNA-Überrepräsentierung auf 6p vorliegt, was bisher noch nicht beschrieben wurde.

Anhand von CGH-Studien (Aldaz et al., 1995, Ried et al., 1995, Tirkkonen et al., 1998) konnten bereits DNA-Überrepräsentierungen auf 6p in Tumoren der Brust nachgewiesen

werden. Durch cytogenetische Analysen wurden in zwei Arbeiten regelmäßige Zugewinne auf 6p in primären und metastasierten Mammakarzinomen gefunden (Trent et al., 1993; Thompson et al., 1993). Weitergehende Studien müssen klären, ob Proto-Onkogene auf 6p existieren, die mit dem invasiv duktalem Mammakarzinomwachstum und dem Östrogenrezeptor-Status assoziiert sind.

Bentz und Mitarbeiter (1998b) fanden einen verminderten oder fehlenden Östrogenrezeptor-Status in einem überwiegenden Teil der Fälle von pleomorphen lobulären Mammakarzinomen, diese gelten als histologische Untergruppe mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose. Der Mechanismus einer verminderten Östrogenrezeptor-Expression im Verlauf der malignen Progression ist noch nicht genau geklärt. Ottaviano et al. (1994) beobachteten jedoch, daß Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszelllinien eine verminderte Östrogenrezeptor-Transskription durch eine Methylierung der 5' Promoterregion erhalten haben.

4.2. Invasiv lobuläre Mammakarzinome

Die invasiv lobulären Tumore zeichneten sich durch eine im Vergleich zu invasiv duktalem Mammakarzinomen kleinere Anzahl von Alterationen pro Tumorfall aus, insbesondere DNA-Gewinne kamen mit geringerer Frequenz vor. Im Vergleich zu invasiv duktalem Karzinomen traten jedoch DNA-Alterationen auf den Chromosomen 16q, 17p, 18q und 22q häufiger auf, was zur Vermutung führt, daß diese Alterationen charakteristische chromosomale Veränderungen der invasiv lobulären Tumorentität darstellen.

DNA-Verluste auf 16q wurden regelmäßig bei Brustkrebs beschrieben (Skirnisdottir et al., 1995; Dorion-Bonnet et al., 1995), und besonders häufig bei invasiv lobulären Mammakarzinomen (Tsuda et al., 1994, Schwendel et al., 1998b). Die jetzt von uns gefundenen DNA-Deletionen auf 16q wiesen eine 95%ige Signifikanz im Bereich der Region 16q13-23 auf. Inzwischen werden zwei bis drei Tumorsuppressorgene auf dem langen Arm des Chromosom 16 angenommen (Sato et al., 1991; Cleton-Jansen et al., 1994). Die entsprechenden Regionen sind 16q22.1, 16q22.2-24.2 und 16q24-qter, als Kandidatengene kommen E-cadherin, BBCI (breast basic conserved I) und das Brustkrebs Antiöstrogen Resistenzgen vor. Das E-cadherin Gen gehört zu einer Gruppe kalziumabhängiger transmembranärer Zelladhäsionsmoleküle, welche wichtig für die Erhaltung der reifen Gewebestruktur sind (Albeda, 1993; Palacios et al., 1995). Möglicherweise besteht bei invasiv

lobulären Karzinomen im Vergleich zu invasiv duktalem eine höhere Mutationsfrequenz im verbleibenden Allel des E-cadherin Gen (Berx et al, 1995).

Ein DNA-Verlust auf Chromosom 17p wurde von uns in 40% der lobulären Fälle detektiert. Auf 17p13.1 ist das Tumorsuppressorgen p53 lokalisiert. Das p53-Protein ist beteiligt an der Zellzyklus- (Steinmeyer et al., 1990; Deppert et al., 1990) und Transkriptionsregulation (Fields und Jang, 1990; Raycroft et al., 1990) sowie an der Differenzierung (Shaulsky et al., 1991) und Apoptose (Shaw et al., 1992). Es wird angenommen, daß das p53-Wildtyp-Allel die Replikation von maligne transformierten Zellen verhindert (Yin et al., 1992). Bei Kolonkarzinomen wurde ein Zusammenhang zwischen LOH auf 17p13.1 und mutierten p53-Proteinen gefunden (Fearon und Vogelstein, 1990). Es wird vermutet, daß hierbei beide Allele inaktiviert sind. Bei Brustkarzinomen ist es noch nicht geklärt, ob eine Inaktivierung beider p53-Allele zu Grunde liegt, Thompson et al. (1992) fanden hier keinen Zusammenhang zwischen p53-Mutationen und LOH auf dem p53-Locus.

Die erstmals von uns mittels CGH gefundenen vermehrten DNA-Deletionen auf 22q korrelieren mit den Ergebnissen aus LOH-Untersuchungen bei lobulären Karzinomen (Larsson et al., 1990). Die Inaktivierung des Neurofibromatose-Typ-2 Gens (nf2), welches auf 22q12 lokalisiert ist, wurde regelmäßig bei Meningiomen detektiert (Papi et al., 1995, Harada et al., 1996), nicht jedoch bei Brustkarzinomen (Yaegashi et al., 1995). Allione und Mitarbeiter (1998) identifizierten bei Brusttumoren 6 Regionen mit LOH auf Chromosom 22q. Die Autoren vermuten entweder eine Anzahl instabiler Regionen auf 22q, woraufhin Chromosomen-Brüche mit großer Häufigkeit stattfinden, oder eine Reihe noch nicht bekannter Tumorsuppressorgene, die in der Genese von Brustkrebs eine Rolle spielen.

Die erhaltenen Ergebnisse führen zu der Vermutung, daß invasiv duktales und invasiv lobuläres Mammakarzinome durch ein charakteristisches chromosomales Alterationsmuster gekennzeichnet sind. Die insgesamt geringere Frequenz an genetischen Alterationen in invasiv lobulären Mammakarzinomen ist sehr wahrscheinlich der Grund für eine gegenüber invasiv duktalem Brusttumoren längere krankheitsfreie Überlebensdauer. Für eine mögliche zukünftige genetische Klassifikation dieser Tumoren bis hin zu neuen Konzepten bei der Therapie des Brustkrebses werden weiterführende genetische Untersuchungen notwendig sein.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der molekularzytogenetischen Charakterisierung von invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinom sowie der Identifizierung unterschiedlicher genetischer Alterationsmuster in Tumorsubgruppen der invasiv duktalem Mammakarzinome. Mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) wurden 30 invasiv duktalem und 20 invasiv lobuläre Mammakarzinome auf genetische Veränderungen untersucht.

In beiden Tumorarten überwiegen DNA-Deletionen gegenüber DNA-Gewinnen, daher scheint die Inaktivierung tumorsupprimierender Gene einen größeren Einfluß auf das maligne Wachstumsverhalten auszuüben. Invasiv duktalem Mammakarzinome zeichnen sich durch eine im Mittel größere Anzahl an Alterationen pro Tumorfall aus als invasiv lobuläre Karzinome (14,9 vs. 8,9). Neben einer größeren Anzahl an DNA-Verlusten ist auch die Anzahl der DNA-Überrepräsentierungen deutlich höher verglichen mit invasiv lobulären Mammakarzinomen (6,2 pro Tumorfall vs. 2,7 pro Tumorfall).

DNA-Gewinne auf Chromosom 1q und DNA-Verluste auf den Chromosomen 6q, 11q22-qter und 13q fanden sich in $\geq 40\%$ der Fälle in beiden histologischen Tumortypen. In invasiv duktalem Mammakarzinomen traten DNA-Gewinne mit größerer Frequenz auf den Chromosomen 6p, 8q, 11q13, 16p, 17q, 19p/q und 20q auf. Ebenfalls häufiger waren DNA-Deletionen auf den Chromosomen 2q, 3p, 4p/q, 5q, 7p, 8p, 9q, 10q und 15q zu finden. DNA-Verluste auf den Chromosomen 16q, 17p, 18q und 22q wurden dagegen vermehrt in invasiv lobulären Karzinomen detektiert.

Gut (G1) und schlecht (G3) differenzierte invasiv duktalem Mammakarzinome zeichnen sich durch ein unterschiedliches genetisches Muster aus. Während gut differenzierte Tumore durch DNA-Gewinne auf 1q, 11q11-13, 16p und 20q gekennzeichnet sind, weisen die schlecht differenzierten Tumore zusätzlich DNA-Deletionen im Bereich der Chromosomen 5q, 18q und 21q21 auf.

Außerdem läßt sich ein unterschiedliches genetisches Muster bei Östrogenrezeptor-positiven und Östrogenrezeptor-negativen invasiv duktalem Mammakarzinomen feststellen. Die Östrogenrezeptor-negativen Tumore zeigen eine größere Anzahl an Alterationen, dazu gehören zusätzliche DNA-Überrepräsentierungen auf 1p, 6p und 22q und DNA-Verluste der Chromosomen 5q, 7p, 8p und 12q.

Somit läßt sich feststellen, daß sich invasiv duktalem und invasiv lobuläre Mammakarzinome durch ein wiederkehrendes Muster chromosomaler Veränderungen charakterisieren lassen.

6. Literatur

- Albeda SM.: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis (review). *Lab invest* **1993**; *68*: 4-17
- Aldaz CM., Chen T., Sahin A., Cunningham J., Bondy M.: Comparative allelotype of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast carcinomas. *Cancer Res.* **1995**; *55(18)*: 3976-3981
- Allione F., Eisinger F., Parc P., Noguchi T., Sobol H., Birnbaum D.: Loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 22q in human sporadic breast carcinomas. *Int. J. Cancer* **1998**; *75*: 181-186
- Altucci L., Addeo R., Cicatiello L., Dauvois S., Parker MG., Truss M., Beato M., Sica V., Bresciani F., Weisz A.: 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* **1996**; *12*: 2315-2324
- Anbazhagan R., Fujii H., Gabrielson E.: Allelic loss of chromosomal arm 8p in breast cancer progression. *Am. J. Pathol.* **1998**; *152(3)*: 915-819
- Anzick SL., Kononen J., Walker RL., Azorsa DO., Tanner MM., Guan XY., Sauter G., Kallioniemi OP., Trent JM., Meltzer PS.: AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **1997**; *277*: 965-968
- Baffa R., Negrini M., Mandes B., Rugge M., Danzani G., Hirohashi S., Croce CM.: Loss of heterozygosity for chromosome 11 in adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **1996**; *56*: 268-273
- Bender HG., Schnürch HG.: Diagnostik und Therapie von malignen Tumoren und deren Vorstadien an der Mamma. Bender HG., Schnürch HG (Hrsg.). *Gynäkologische Onkologie*, Stuttgart: Thieme **1991**, 347-354
- Bentz M., Huck K., du Manoir S., Joos S., Werner CA., Fischer K., Döhner H., Lichter P.: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood.* **1995** ; *85(12)*: 3610-3618
- Bentz M., Plesch A., Stilgenbauer S., Dohner H., Lichter P.: Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **1998a**; *21(2)*: 172-175
- Bentz JS., Yassa N., Clayton F.: Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic features of 12 cases. *Mod. Pathol.* **1998b**; *11(9)*: 814-822
- Berx G., Cleton-Jansen AM., Nollet F., de Leeuw WJ., van de Vijver M., Cornelisse C., van Roy F.: E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancer. *EMBO J* **1995**; *14*: 6107-6115
- Bethwaite PB., Koreth J., Herrington CS., Mc Gee JO.: Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on Chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma. *Br. J. Cancer* **1995**; *71*: 814-818
- Bieche I., Liederan R.: Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1995**; *14*:227-251
- Bland KI., Konstadoulakis MM., Vezeridis MP., Wanebo HJ.: Oncogene protein co-expression. Value of Ha-ras, c-myc, c-fos, and p 53 as prognostic discriminants for breast carcinoma. *Ann Surg.* **1995**; *221(6)*: 706-720
- Böcker W., Kunze KD.: Mamma: Bösartige Tumoren, In: Böcker W.,Denk H., Heitz PhU. (Hrsg.), *Pathologie*, München Wien Baltimore, Urban & Schwarzenberg, **1997**, S. 857-866
- Bockmühl U., Petersen S., Schmidt S., Wolf G., Jahnke V., Dietel M., Petersen I.: Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.* **1997**; *57(23)*: 5213-5216

- Bockmühl U., Wolf G., Schmidt S., Schwendel A., Jahnke V., Dietel M., Petersen I.: Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* **1998**; *20(2)*: 145-151
- Borg A., Zhang QX., Alm P., Olsson H., Sellberg G.: The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of gene expression. *Cancer Res.* **1992**; *52*: 2991-2994
- Brewster SF., Gingell JC., Browne S., Brown KW.: Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer* **1994**; *70(4)*: 697-700
- Brison O.: Gene amplification and tumour progression. *Biochym Biophys Acta* **1993**; *1155*: 25-41
- Bukholm IK., Nesland JM., Karesen R., Jacobsen U., Borresen-Dale AL.: Expression of E-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. *Virchows Arch.* **1997**; *431*: 317-321
- Carlson KM., Bruder C., Nordenskjold M., Dumanski JP.: 1p and 3p deletions in meningiomas without detectable aberrations of chromosome 22 identified by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **1997**; *20(4)*: 419-424
- Carter SL., Negrini M., Baffa R., Gillum DR., Rosenber AL., Schwartz GF., Croce CM.: Loss of heterozygosity at 11q23-23 in breast cancer. *Cancer Res.* **1994**; *54*: 6270-6274
- Casolo P., Raspadori A., Drei B., Amuso D., Mosca D., Amorotti C., Di Blasio P., De Maria R., De Luca G., Colli G., Ganz E.: Natural history of breast cancer: lobular carcinoma versus ductal carcinoma in our experience. *Ann. Ital. Chir.* **1997**; *68(1)*: 43-47
- Chang-Claude J., Becher H., Hamann U., Schroeder-Kurth T.: Risikoabschätzung für das familiäre Auftreten von Brustkrebs. *Zentralbl Gynäkol* **1995**; *117*: 423-434
- Chappell SA., Walsh T., Walker RA., Shaw JA.: Loss of heterozygosity at chromosome 6q in preinvasive and early invasive breast carcinomas. *Br. J. Cancer* **1997**; *75(9)*: 1324-1329
- Chen LC., Matsumura K., Deng G., Kurisu W., Ljung BM., Lerman MI., Waldman FM., Smith HS.: Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. *Cancer Res.* **1994**; *54*: 3021-3024
- Cher ML., MacGrogan D., Bookstein R., Brown JA., Jenkins RB., Jensen RH.: Comparative genomic hybridization allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1994**; *11(3)*: 153-162
- Clark GM., McGuire WL.: Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* **1991**; *51(3)*: 944-948
- Cleton-Jansen AM., Moerland EW., Kuipers-Dighshoorn NJ., Callen DF., Sutherland GR., Hansen B., Devilee P., Cornelisse CJ.: At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1994**; *9*: 101-107
- Coagner FB.: History of breast disease and its treatment. In: Bland KI., Copeland EM.: *The breast*; Philadelphia USA, Saunders, **1991**: 166
- Clifford SC., Prowse AH., Affara NA., Buys CH., Maher ER.: Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* **1998**; *22(3)*: 200-209
- Courjal F., Louason G., Speiser P., Katsaros D., Zeillinger R., Theillet C.: Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. Cancer* **1996**; *69(4)*: 247-253
- Courjal F., Theillet C.: Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res.* **1997**; *57(19)*: 4368-4377

- Cremer T., Jauch A., Ried T., Schröck E., Lengauer C., Cremer M., Speicher MR.: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Dt. Ärztebl. **1995**; 92: A-1593-1601 [*Heft 22*]
- Cropp CS., Liedreau R., Campbell G., Champene MH., Callahan R.: Loss of heterozygosity on chromosome 17 and 18 in breast carcinoma: Two additional regions identified. Proc. Natl. Acad. Sci. **1990**; 87: 7737-7741
- De Corte V., De Potter C., Vandenberghe D., Van Laerebeke, Azam M., Roels H., Mareel M., Vanderkerckhove J.: A 50-kDa protein present in conditioned medium of COLO-16 cells stimulates cell spreading and motility and activates tyrosin phosphorylation of Neu/Her-2 in human SK-BR-3 mammary cancer cells. J. Cell. Sci. **1994**; 107: 405-416
- Deng G., Chen LC., Schott DR., Thor A., Bhargava V., Ljung BM., Chew K., Smith HS.: Loss of heterozygosity and p 53 mutations in breast cancer. Cancer Res. **1994**; 54(2): 499-505
- Deppert W., Buschhausen-Denker G., Patschinsky T., Steinmeyer K.: Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. II. Requirement for cell cycle progression. Oncogene **1990**; 5: 1701-1706
- Devilee P., Van Villet M., Van Sloun P., Kuipers Dijkshoorn M., Hermans J., Pearson PL., Cornelisse LJ.: Allelotype of human breast carcinoma: a second major site for loss of heterozygosity is on chromosome 6q. Oncogene **1991**; 6: 1705-1711
- Devilee P., Schuurin E., van de Vijer MJ., Cornelisse CJ.: Recent developments in the molecular genetic understanding of breast cancer. Crit Rev Oncol **1994**; 5: 247-270
- Di Fiore PP., Pierce JH., Kraus MH., Segatto O., King CR., Aaronson SA.: ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3TH cells. Science **1987**; 237: 178-182
- Dorion-Bonnet F., Mautalen S., Hostein I., Longy M.: Allelic imbalance study of 16q in human primary breast carcinoma using microsatellite markers. Genes Chromosomes Cancer **1995**; 14(3): 171-181
- Dublin EA., Neera KP., Gillett CE., Smith P., Peters G., Barnes DM.: Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. Int. J. Cancer **1998**; 79: 71-75
- Du Manoir S., Speicher MR., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicaud M., Lichter P., Cremer T.: Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum. Genet. **1993**; 90: 590-610
- Dutrillaux B., Gerbault-Seureau M., Zafrani B.: Characterization of chromosomal abnormalities in human breast cancer. Cancer Genet. Cytogenet. **1990**; 49: 203-217
- Eagle LR., Yin X., Brothman AR., Williams BJ., Atkin NB., Prochownik EV.: Mutation of the MXII gene in prostate cancer. Nature Genet **1995**; 9: 249-255
- Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. THE LANCET **1998**; 351: 1451-1467
- Farabegoli F., Ceccarelli C., Santini D., Trere' D., Baldini N., Taffurelli M., Derenzini M.: Chromosome 1 aneusomy with 1p36 under-representation is related to histologic grade, DNA aneuploidy, high c-erbB-2 and loss of bcl-2 expression in ductal breast carcinoma. Int. J. Cancer. **1996**; 69: 381-385
- Fearon ER., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell **1990**; 61: 759-767
- Fields S., Jang SK.: Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science **1990**; 249: 1046-1049
- Fukushige SI., Matsubara KI., Yoshida M., Sasaki M., Suzuki T., Semba K., Toyshima K., Yamamoto T.: Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol. Cell. Biol. **1986**; 6: 955-959

- Garcia-Foncillas J., Zornoza G., Martinez MJ., Gonzalez MJ., Hidalgo OF., Brugarolas A., Moreno-Palanques RF.: Genetic instability, oncogene expression and/or DNA methylation is associated with inactivation of estrogen receptor (ER) in breast cancer (Meeting abstract). Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. **1996**; 37: A3965
- Gaudray P., Szepietowski P., Escot C., Birnbaum D., Theillet C.: DNA amplification at 11q13 in human cancer: From complexity to perplexity. Mutat. Res. **1992**; 3: 317-328
- Geradts J., Kratzke RA., Niehans GA., Lincoln CE.: Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase-inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INKFA in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. Cancer Res. **1995**; 55: 6006-6011
- Gillett C., Fantl V., Smith R., Fisher C., Bartek J., Dickson C., Barnes D., Peters G.: Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. Cancer Res. **1994**; 54: 1812-1817
- Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell **1991**; 66(3): 589-600
- Gusterson BA., Machin LG., Gullick WJ., Gibbs NM., Powles TJ., Elliott C., Ashley S., Monaghan P., Harrison S.: c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. Br. J. Cancer **1988**; 58: 453-457
- Habuchi T., Luscombe M., Elder PA., Knowles MA.: Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. Genomics **1998**; 48(3): 277-288
- Hall M., Peters G.: Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. Adv. Cancer Res. **1996**; 68: 67-108
- Hamann U., Herbold C., Costa S., Solomayer EF., Kaufmann M., Bastert G., Ulmer HU., Frenzel H., Komitowski D.: Allelic imbalance on chromosome 13q: Evidence for the involvement of BRCA2 and RB1 in sporadic breast cancer. Cancer Res. **1996**; 56: 1988-1990
- Hampton GM., Mannermaa A., Winqvist R., Alavaikko M., Blanco G., Taskinen PJ., Kiviniemi H., Newsham I., Cavenee WK., Evans GA.: Loss of heterozygosity in human sporadic breast carcinoma: a common region between 11q22 and 11q23.3. Cancer Res. **1994**; 54(17): 4586-4589
- Harada T., Irving RM., Xuereb JH., Barton DE., Hardy DG., Moffat DA., Maher ER.: Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis-type-2 tumor-suppressor gene in sporadic meningioma. J. Neurosurg. **1996**; 84: 847-851
- Herbst RA., Larson A., Weiss J., Cavenee WK., Hampton GM., Arden KC.: A defined region of loss of heterozygosity at 11q23 in cutaneous malignant melanoma. Cancer Res. **1995**; 55: 2494-2496
- Hui R., Ball JR., Macmillan RD., Kenny FS., Prall OWJ., Campbell DH., Cornish AL., McClelland A., Daly RJ., Forbes JF., Blamey RW., Musgrove EA., Robertson JFR., Nicholson RI., Sutherland RL.: EMS1 gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. Oncogene **1998**; 17: 1053-1059
- Imbert A., Chaffanet M., Essioux L., Noguchi T., Adelaide J., Kerangueven F., Le Paslier D., Bonaiti-Pellie C., Sobol H., Birnbaum D., Pebusque MJ.: Integrated map of the chromosome 8p12-p21 region, a region involved in human cancers and Werner Syndrome. Genomics **1996**; 32: 29-38
- Isola J., Visakorpi T., Holli K., Kallioniemi OP.: Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. **1992**; 84(14): 1109-1114

- Isola J., DeVries S., Chu L., Ghazvini S., Waldman F.: Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am. J. Pathol.* **1994**; *145(6)*: 1301-1308
- Isola JJ., Kallioniemi OP., Chu LW., Fuqua SA., Hilsenbeck SG., Osborne CK., Waldman FM.: Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.* **1995**; *147(4)*: 905-911
- Isshiki K., Elder DE., Guerry D., Linnenbach AJ.: Chromosome 10 allelic loss in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **1993**; *8*: 178-184
- James LA., Mitchell EL., Menasce L., Varley JM.: 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* **1997**; *14(9)*: 1059-1065
- Jeng MH., Shupnik MA., Bender TP., Westin EH., Bandyopadhyay D., Kumar R., Masamura S., Santen RJ.: Estrogen receptor expression and function in long-term Estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* **1998**; *139*: 4164-4174
- Jones N.: Structure and function of transcription factors. *Semin. Cancer Biol.* **1990**; *1*: 5-17
- Kallioniemi A., Kallioniemi OP., Sudar D., Rutovitz D., Gray JW., Waldman F., Pinkel D.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **1992**; *258*: 818-821
- Kallioniemi A., Kallioniemi OP., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith HS., Pinkel D., Gray JW., Waldman FM.: Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994a**; *91*: 2156-2160
- Kallioniemi OP., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman FM., Gray JW., Pinkel D.: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **1994b**; *10*: 231-243
- Kelsey JL., Berkowitz GS.: Breast cancer epidemiology. *Cancer Res.* **1988**; *48*: 5615-5623
- Kelsey JL., Gammon MD.: Epidemiology of breast cancer. *Epidemiol. Rev.* **1990**; *12*: 228-240
- Kerangueven F., Essioux L., Dib A., Noguchi T., Allione F., Geneix J., Longy M., Lidereau R., Eisinger F., Pebusque MJ., Jacquemir J., Bonaiti-Pellie C., Sobol H., Birnbaum D.: Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. *Oncogene* **1995**; *10*: 1023-1026
- Kinzler KW., Nilbert MC., Su LK., Vogelstein B., Bryan TM., Levy DB., Smith KJ., Preisinger AC., Hedge P., McKechnie D., Finniear R., Markham A., Groffen J., Boguski MS., Aschul FS., Horii A., Ando H., Miyoshi Y., Miki Y., Nishisho I., Nakamura Y.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **1991**; *253*: 661-665
- Knowles MA., Shaw ME., Proctor AJ.: Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* **1993**; *8*: 1357-1364
- Koreth J., Bakkenist CJ., Mc Gee JO.: Allelic deletions at chromosome 11q22-23.1 and 11q25-qterm are frequent in sporadic breast but not colorectal cancers. *Oncogene* **1997**; *14*: 431-437
- Kratzke RA., Greatens TM., Rubins JB., Maddaus MA., Niewoehner DE., Niehans GA., Geradts J.: RB and p16INK4 expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res.* **1996**; *56*: 3415-3420
- Kreipe H., Feist H., Fischer L., Felgner J., Heidorn K., Mettler L., Parwaresch R.: Amplification of c-myc but not of c-erbB-2 is associated with high proliferative capacity in breast cancer. *Cancer Res.* **1993**; *53*: 1956-1961

- Kuuskašjarvi T., Tanner M., Pennanen S., Karhu R., Kallioniemi OP., Isola J.: Genetic changes in intraductal breast cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* **1997**; *150(4)*: 1465-1471
- Lammie GA., Peters G.: Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* **1991**; *3*: 413-420
- Lammie GA., Fantl V., Smith R., Schuurin E., Brookes S., Michalides R., Dickson C., Arnold A., Peters G.: D11s287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene* **1991**; *6*: 439-444
- Larsson C., Bryström C., Skoog L., Rotstein S., Nordenskjöld M.: Genomic alterations in human breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **1990**; *2*: 191-197
- Leder A., Pattengale PK., Kuo A., Stewart TA., Leder P.: Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. *Cell* **1986**; *45*: 485-495
- Mahlamaki EH., Hoglund M., Gorunova L., Karhu R., Dawiskiba S., Andren-Sandberg A., Kallioniemi OP., Johansson B.: Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1997**; *20(4)*: 383-391
- Marchetti A., Buttita F., Pellegrini S., Campani D., Diella F., Cecchetti D., Callahan R., Bistocchi M.: p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* **1993**; *53*: 4665-4669
- Martinazzi M., Crivelli F., Zampatti C., Martinazzi S.: Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry in different histological types of infiltrating breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **1993**; *46*: 1009-1010
- Meichle A., Philipp A., Eilers M.: The function of myc proteins. *Biochim Biophys Acta* **1992**; *1114*: 129-146
- Moll R., Mitze M., Frixen UH., Birchmeier W.: Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Amer. J. Pathol.* **1993**; *143*: 1731-1742
- Murphy DS., McHardy P., Coutts J., Mallon EA., George WD., Kaye SB., Brown R., Keith WN.: Interphase cytogenetic analysis of erbB-2 and topo I-alpha co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ. *Int. J. Cancer* **1995**; *64*: 18-26
- Nishizaki T., Isola J., Kallioniemi O., Kallioniemi A., Weidner N., Chew K., Waldman FM.: Genetic changes in lobular breast cancers detected by comparative genomic hybridization (Meeting abstract). *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* **1995**; *36*: A3286
- Nishizaki T., DeVries S., Chew K., Goodson III WH., Ljung BM., Thor A., Waldman FM.: Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **1997a**; *19(4)*: 267-272
- Nishizaki T., Chew K., Chu L., Isola J., Kallioniemi A., Weidner N., Waldman FM.: Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int. J. Cancer* **1997b**; *74(5)*: 513-517
- Nishizuka S., Tamura S., Terashima M., Satodate R.: Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J. Pathol.* **1998**; *185(1)*: 38-43
- Nupponen NN., Hyytinen ER., Kallioniemi AH., Visakorpi T.: Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1998**; *101(1)*: 53-57
- Ohgaki K., Iida A., Kasumi F., Sakamoto G., Akimoto M., Nakamura Y., Emi M.: Mapping of a new target region of allelic loss to a 6-cM interval at 21q21 in primary breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **1998**; *23(3)*: 244-247

- Ottaviano YG., Issa JP., Parl FF.: Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **1994**; *54*: 2552-2555
- Page DL., Dupont WD.: Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast cancer. *Cancer* **1990**; *66*: 1326-1335
- Paik S., Bryant J., Park C., Fisher B., Tan-Chiu E., Hyams D., Fisher ER., Lippmann ME., Wickerham DL., Wolmark N.: erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**; *90(18)*: 1361-1370
- Palacios J., Benito N., Pizarro A., Suarez A., Espada J., Cano A., Gamallo C.: Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am. J. Pathol.* **1995**; *146*: 605-612
- Pandis N., Jin Y., Limon J., Bardi G., Idvall I., Mandahl N., Mitelman F., Heim S.: Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 as a primary chromosome abnormality in carcinomas of the breast. *Genes Chromosomes Cancer* **1993**; *6*: 151-155
- Pandis N., Bardi G., Mitelman F., Heim S.: Deletion of the short arm of chromosome 3 in breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **1997**; *18*: 241-245
- Papi L., De Vitis LR., Vitelli F., Ammannati F., Mennonna P., Montali E., Bigozzi U.: Somatic mutations in the neurofibromatosis-type-2 gene in sporadic meningiomas. *Hum. Genet.* **1995**; *95*: 347-351
- Petersen I., Schwendel A., Bockmühl U., Dietel M.: Die komparative genomische Hybridisierung: Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik. *Pathologe* **1996**; *17*: 333-341
- Petersen I., Langreck H., Wolf G., Schwendel A., Psille R., Vogt P., Reichel MB., Ried T., Dietel M.: Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosome 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br. J. Cancer* **1997**; *75*: 79-86
- Polito P., Cin PD., Pauwels P., Christiaens M., Van den Berghe I., Moerman P., Vrints L., Van den Berghe H.: An important subgroup of phyllodes tumors of the breast is characterized by rearrangements of chromosome 1q and 10q. *Oncol. Rep.* **1998**; *5(5)*: 1099-1102
- Prall OWJ., Sarcevic B., Musgrove EA., Watts CKW., Sutherland RL.: Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J. Biol. Chem.* **1997**; *272*: 10882-10894
- Prendergast GC., Lawe D., Ziff EB.: Association of myn, the murine homologue of max with c-myc stimulating methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **1991**; *65*: 395-407
- Raycroft L., Wu H., Lozano G.: Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* **1990**; *249*: 1049-1051
- Rempel SA., Schwechheimer K., Davis RL., Cavaneer WK., Rosenblum ML.: Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res.* **1993**; *53*: 2386-2392
- Resnitzky D., Gossen M., Bujard H., Reed SI.: Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **1994**; *14*: 1669-1679
- Rhei E., Kang L., Bogomolny F., Federici MG., Borgen PI., Boyd J.: Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res.* **1997**; *57(17)*: 3657-3659
- Ried T., Petersen I., Holtgreve-Grez H., Speicher MR., Schröck E., du Manoir S., Cremer T.: Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **1994**; *54*: 1801-1806

- Ried T., Just KE., Holtgreve-Grez H., du Manoir S., Speicher MR., Schröck E., Latham C., Blegen H., Zetterberg A., Cremer T., Auer G.: 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.* **1995**; *55*: 5415-5423
- Roth K., Wolf G., Dietel M., Petersen I.: Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH). *Pathologie* **1996**; *17*: 342-348
- Rusty AK., Dyson N., Bernards R.: Amino terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* **1991**; *352*: 541-544
- Sato T., Tanigami A., Yamakawa K., Akiyama F., Kasumi F., Sakamoto G., Nakamura Y.: Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res.* **1990**; *50*: 7814-7819
- Sato T., Akiyama F., Sakamoto G., Kasumi F. und Nakamura Y.: Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res.* **1991**; *51*:5794-5799
- Sauter G.: Rudolf Virchow Prize 1997. Molecular cytogenetic analysis of superficial urothelial cancer of the bladder. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **1997**; *81*: 18-27
- Schneider NR., Williams WR., Chaganti RSK.: Genetic epidemiology of familial aggregation of cancer. *Adv. Cancer Res.* **1986**; *47*: 1-36
- Schreiber-Agus N., Meng Y., Hoang T., Hou H. Jr, Chen K., Greenberg R., Cordon-Cardo C., Lee HW., DePinho RA.: Role of Mx1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. *Nature* **1998**; *393*(6684): 483-487
- Schwendel A., Richard F., Langreck H., Kaufmann O., Lage H., Winzer KJ., Petersen I., Dietel M.: Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosomes 4q and 21q. *Br. J. Cancer* **1998a**; *78*(6): 806-811
- Schwendel A., Richard F., Pacyna-Gengelbach M., Petersen I., Winzer KJ., Dietel M.: DNA copy number changes in lobular breast carcinomas. 17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 24.- 28. August **1998b**; Congress Paper: 753-757
- Seitz S., Rohde K., Bender E., Nothnagel A., Pidde H., Ullrich OM., El-Zehairy A., Haensch W., Jandrig B., Kölbl K., Schlag PM., Scherneck S.: Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of the human chromosome region 8p12-p22 in breast carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **1997**; *76*(8): 983-991
- Sekido Y., Bader S., Latif F., Gnarr JR., Gazdar AF., Linehan WM., Zbar B., Lerman MI., Minna JD.: Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene* **1994**; *9*(6): 1599-1604
- Sekido Y., Ahmadian M., Wistuba IL., Latif F., Bader S., Ming-Hui W., Wei MH., Duh FM., Gazdar AF., Lerman MI., Minna JD.: Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene* **1998**; *16*: 3151-3157
- Serrano M., Hannon G., Beach D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **1993**; *366*: 704-707
- Shaulsky G., Goldfinger N., Peled A., Rotter V.: Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**; *88*: 8982-8986
- Shaw P., Bavey R., Tardy S., Sahli R., Sordat B., Costa J.: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**; *89*: 4495-4499
- Shaw ME, Knowles MA.: Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes Chromosomes Cancer* **1995**; *13*: 1-8
- Sherr CJ.: Mammalian G1 cyclins. *Cell* **1993**; *73*: 1059-106

- Silverstein MJ., Lewinsky BS., Waisman JR., Gierson ED., Colburn WJ., Senofsky GM., Gamagami P.: Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from Infiltrating duct carcinoma? *Cancer* **1994**; *73*: 1673-1677
- Sinn HP., Kellerhoff NM., Kellerhoff R., Bastert G., Otto HF.: Subtypisierung und Prognoseabschätzung beim invasiven lobulären Mammakarziom. *Pathologie* **1997**; *18*: 37-44
- Skirnisdottir S., Eiriksdottir G., Baldursson T., Barkardottir RB., Egilsson V., Ingvarsson S.: High frequency of allelic imbalance at chromosome region 16q22-23 in human breast cancer: correlation with high PgR and low s-phase. *Int. J. Cancer* **1995**; *64*: 112-116
- Slamon DJ., Clark GM., Wong SG., Levin WJ., Ullrich A., McGuire WL.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* **1987**; *235*: 177-181
- Sonoda G., Palazzo J, du Manoir S, Godwin AK, Feder M, Yakushiji M, Testa JR.: Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **1997**; *20(4)*: 320-328
- Sozzi G., Veronese ML., Negrini M., Baffa R., Coticelli MG., Inoue H., Torielli S., Pilotti S., De Gregorio L., Pastorino U., Pierotti MA., Ohta M., Huebner K., Croce CM.: The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* **1996**; *85*: 1-20
- Staibano S., Migogna MD., Lo Muzio L., Di Alberti L., Di Natale E., Lucariello A., Mezza E., Bucci E., DeRosa G.: Overexpression of cyclin-D1, bcl-2, and bax proteins, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA-ploidy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Hum. Pathol.* **1998**; *29(11)*: 1189-1194
- Steck PA., Pershouse MA., Jasser Sa., Yung WK., Lin H., Ligon AH., Langford LA., Baumgard ML., Hattier T., Davis T., Frye C., Hu R., Swedlund B., Teng DH., Tavtigian SV.: Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* **1997**; *15(4)*: 356-362
- Steinmeyer K., Maacke H., Deppert W.: Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* **1990**; *5*: 1691-1700
- Suzuki H., Emi M., Komiya A., Fujiwara Y., Yatani R., Nakamura Y., Shimazaki J.: Localization of a tumour suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes Cancer* **1995**; *13*: 168-174
- Swift M., Morrell D., Massey RB., Chase CL.: Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-teleangiectasia. *N.Engl. J. Med.* **1991**; *325*: 1831-1836
- Takeichi M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* **1991**; *251*: 1451-1455
- Tanaka K., Kikuchi-Yanoshita R., Muraoka M., Konishi M., Oshimura M., Miyaki M.: Suppression of tumorigenicity and invasiveness of colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 8p12-pter. *Oncogene* **1996**; *12*: 405-410
- Tanner MM., Karhu RA., Nupponen NN., Borg A., Baldetorp B.; Pejovic T., Ferno M., Killander D., Isola JJ.: Genetic aberrations in hypodiploid breast cancer: frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 oncogene. *Am. J. Pathol.* **1998**; *153(1)*: 191-199
- Tavassoli FA.: Infiltrating lobular carcinoma. In: Tavassoli FA. (Hrsg.), *Pathology of the breast*. Norwalk: Appleton and Lange **1992**; 307-315
- Teng DH., Hu R., Lin H., Davis T., Iliev D., Frye C., Swedlund B., Hansen KL., Vinson VL., Gumpfer KL., Ellis L., El-Naggar A., Frazier M., Jasser S., Langford LA., Lee J., Mills GB., Pershouse MA., Pollack RE., Tornos C., Troncso P., Yung WK., Fujii G., Berson A., Steck PA. et al.: MMAC1/PTEN mutations in primary specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* **1997**; *57(23)*: 5221-5225

- Terada T., Ashida K., Endo K., Horie S., Maeta H., Matsunaga Y., Takashima K., Ohta T., Kitamura Y.: c-erbB-2 protein is expressed in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Histopathology* **1998**; *33(4)*: 325-331
- Thompson AM., Anderson TJ., Condie A., Prosser J., Chetty U., Carter DC., Evans HJ., Steel CM.: p53 allele losses, mutations, and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathological parameters. *Int. J. Cancer* **1992**; *50*: 528-532
- Thompson F., Emerson J., Dalton W., Yang JM., McGee D., Villar H., Knox S., Massey K., Weinstein R., Bhattacharyya A.: Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas. I. Twenty-eight cases with primary disease. *Genes Chromosomes Cancer* **1993**; *7(4)*: 185-193
- Tirkkonen M., Tanner M., Karhu R., Kallioniemi A., Isola J. and Kallioniemi OP.: Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* **1998**; *21*:177-184
- Trent J., Yang JM., Emerson J., Dalton W., McGee D., Massey K., Thompson F., Villar H.: Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas. II. Thirty-four cases with metastatic disease. *Genes Chromosomes Cancer* **1993**; *7(4)*: 194-203
- Tsai YC., Nichols PW., Hiti AL., Williams Z., Skinner DG., Jones PA.: Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* **1990**; *50(1)*: 44-47
- Tsuda H., Hirohashi S., Shimosato Y., Hirota T., Tsugane S., Yamamoto H., Miyajima N., Toyoshima K., Yamamoto T., Yokota J., Yoshida T., Sakamoto H., Terada M., Sugimura T.: Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res.* **1989**; *49(11)*: 3104-3108
- Tsuda H., Callen DF., Fukotomi T., Nakamura Y., Hirohashi S.: Allele loss on chromosome 16q24.2-qter occurs frequently in breast cancers irrespectively of differences in phenotype and extend of spread. *Cancer Res.* **1994**; *54(2)*: 513-517
- Tsuda H., Sakamaki C., Tsugane S., Fukutomi T., Hirohashi S.: Prognostic significance of accumulation of gene and chromosome alterations and histological grade in node-negative breast carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **1998**; *Jan 28(1)*: 5-11
- Van de Vijver MJ.: Molecular genetic changes in human breast cancer. *Adv. Cancer Res.* **1993**; *61*: 25-56
- Voorter C., Joos S., Bringuir PP., Vallinga M., Poddighe P., Schalken J., du Manoir S., Ramaekers F., Lichter P., Hopman A.: Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* **1995**; *146(6)*: 1341-1354
- Vos CBJ., Cleton-Jansen AM., Berx G., de Leeuw WJF., ter Haar NT., van Roy F., Cornelisse CJ., Peterse JL., van de Vijver MJ.: E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br. J. Cancer.* **1997**; *76(9)*: 1131-1133
- Weber RG., Bostrom J., Wolter M., Baudis M., Collins VP., Reifenberger G., Lichter P.: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**; *94(26)*: 14719-14724
- Weinberg RA.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **1995**; *81*: 323-330
- Wellings SR., Jensen HM., Marcum RG.: An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**; *55*: 231-273
- Willem P., Mendelow B.: 12p rearrangement and DNA amplification mapped by comparative genomic hybridization in a patient with secondary myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **1997**; *99(1)*: 30-37
- Winqvist R., Hampton GM., Mannermaa A., Blanco G., Alavaikko M., Kiriniemi H., Taskinen PJ., Evans GA., Wright FA., Newsham I., Cavenee WK.: Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res.* **1995**; *55*:

- Wittekind CH., Wagner G.: Klassifikation von Mammakarzinomen, In: Wittekind CH., Wagner G. (Hrsg.), TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 5. Auflage, Berlin Heidelberg, Springer **1997**;
- Wooster R., Neuhausen SL., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyen K., Seal S., Trau T., Averill D. et al.: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13. *Science* **1994**; *265*: 2088-2090
- Wu H., Reynolds AB., Kanner SB., Vines RR., Parsons JT.: Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol. Cell. Biol.* **1991**; *11*: 5113-5124
- Yaegashi S., Sachse R., Okuchi N., Mori S., Sekiya T.: Low incidence of a nucleotide-sequence alteration of the neurofibromatosis-type-2 gene in human breast cancers. *Jap. J. Cancer Res.* **1995**; *86*: 929-933
- Yaremko ML., Kutza C., Lyzak J., Mick R., Recant WM., Westbrook CA.: Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behavior in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1996**; *16*: 189-195
- Yeatman TJ., Bland KI.: Staging of breast cancer. In: Bland KI., Copeland EM. (Hrsg.): *The breast*. Philadelphia USA, Saunders **1991**: 313-330
- Yeatman TJ., Cantor AB., Smith TJ., Smith SK., Reitgen DS., Miller MS., Ku NN., Baekkey PA., Cox CE.: Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Ann. Surg.* **1995**; *222(4)*: 549-559
- Yin Y., Tainsky MA., Bischoff FZ., Strong LC., Wahl GM.: Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **1992**; *70*: 937-948
- Yokota T., Matsumoto S., Yoshimoto M., Kasumi F., Akiyama F., Sakamoto G., Nakamura Y., Emi M.: Mapping of a breast cancer tumor suppressor gene locus to a 4-cM interval on chromosome 18q21. *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**; *Oct 88(10)*: 959-964
- Yu D., Hung MC.: Expression of activated *rat neu* oncogene is sufficient to induce experimental metastasis in 3T3 cells. *Oncogene* **1991**; *6*: 1991-1996

Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA	Bovine Serum Albumin
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
DABCO	1,4 Diazobicyclooctan
DAPI	4,6 diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein Avidin
KCl	Kaliumchlorid
LOH	Loss of heterozygosity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium chlorid sodium citrat
TDLE	Terminale duktulo-lobuläre Einheit
TRITC	Anti-Dig-Rhodamin
UICC	Internationale Union gegen den Krebs

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Richard
Vorname	Frank
Geburtsdatum/-ort	15.07.69, Freiburg
Anschrift	Lynarstr.26 13353 Berlin
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1977-1981	Grundschule in Freiburg
1981-1989	Gymnasium in Freiburg, Abitur

Hochschulbildung:

1991-1992	Studium Chemieingenieurwesen, Abbruch
1993-1995	Studium der Medizin an der Universität Rostock
1996-1998	Studium der Medizin an der Humboldt-Universität zu Berlin/ Charite´
1996	Physikum
1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

1997-1998	„Chromosomale Imbalancen invasiv duktaler und invasiv lobulärer Mammakarzinome detektiert mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH)“ am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charite´ der Humboldt-Universität zu Berlin
-----------	---

Publikationen:

Bauer M., Schulz-Wendtland R., van t’Hooft E., Richard F.: The new development of an afterloading applicator for the primary treatment of endometrial carcinoma. The first clinical empirical report. [German] Strahlenther. Onkol. **1991**; 167(9): 545-548

Schwendel A., Richard F., Langreck H., Kaufmann O., Lage H., Winzer KJ., Petersen I., Dietel M.: Chromosome alterations in breast carcinomas: frequent involvement of DNA losses including chromosome 4q and 21q; British Journal of Cancer **1998** ; 78(6): 806-811

Schwendel A., Richard F., Pacyna-Gengelbach M., Petersen I., Winzer KJ., Dietel M.: DNA copy number changes in lobular breast carcinomas. 17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 24.- 28. August **1998**; Congress Paper : 753-757

Richard F., Pacyna-Gengelbach M., Szymas J., Winzer KJ., Petersen I., Dietel M., Schwendel A.: Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. Breast Cancer and Treatment; submitted

Berlin, 07.01.98

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Dietel möchte ich für die Überlassung des Themas, für die Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die Ermöglichung dieser Promotion am Institut für Pathologie der Charité herzlich danken.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. A. Schwendel, die mich jederzeit unterstützte und viele wertvolle fachliche und methodische Hinweise gab. Ihre ständige Bereitschaft, über Problemlösungen zu diskutieren, und ihre unermüdliche Motivation in schwierigen Phasen trugen wesentlich zum Gelingen des Projektes bei.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau M. Pacyna-Gengelbach für die freundliche Hilfe bei den molekularbiologischen Methoden und der digitalen Bildverarbeitung.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. I. Petersen für die vielen konstruktiven Anregungen und die umfassende fachliche Unterstützung recht herzlich danken.

Herrn Dr. med. KJ. Winzer bin ich für die Bereitstellung und gute Qualität der Tumorproben sehr dankbar, und auch bei Herrn Dr. rer. nat. P. Hufnagel möchte ich mich für seine Hilfe vor allem bei technischen Problemen bedanken.

An die akademische Verwaltung des Universitätsklinikums Charité richtet sich mein Dank für die finanzielle Unterstützung in Form der studienbegleitenden Forschungsförderung.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Charité, die mir beim Erstellen dieser Arbeit behilflich waren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 30.12.98

Frank Richard