

AUS DEM LEHRSTUHL *bzw.* DER ABTEILUNG
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. OLAF ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EVALUATION ALTERNATIVER HYBRIDISIERUNGSMARKER FÜR DIE BESTIMMUNG
EINER "ECHTEN" POLYSOMIE 17 UND ZUR DIFFERENZIERUNG DIAGNOSTISCH
ZWEIFELHAFTER FÄLLE BEIM INVASIVEN MAMMAKARZINOM

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria-Anna Holzschuh

JAHR 2020

*AUS DEM LEHRSTUHL bzw. DER ABTEILUNG
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. OLAF ORTMANN*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*EVALUATION ALTERNATIVER HYBRIDISIERUNGSMARKER FÜR DIE BESTIMMUNG
EINER "ECHTEN" POLYSOMIE 17 UND ZUR DIFFERENZIERUNG DIAGNOSTISCH
ZWEIFELHAFTER FÄLLE BEIM INVASIVEN MAMMAKARZINOM*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria-Anna Holzschuh

JAHR 2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Gero Brockhoff*

2. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Gaumann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2020

Inhaltsverzeichnis

1	GRUNDLAGEN ZUM FORSCHUNGSSTAND	1
1.1	Bedeutung einer Her2-Überexpression beim invasiven Mammakarzinom.....	1
1.2	Anti-Her2 Therapie beim Her2-positiven Mammakarzinom	5
1.3	Möglichkeiten der pathologischen Her2-Diagnostik.....	7
1.3.1	Immunhistochemie (IHC)	7
1.3.2	In-situ-Hybridisierung (ISH).....	8
1.3.3	Andere diagnostische Möglichkeiten	10
1.4	Richtlinien für die pathologische Her2-Diagnostik.....	12
1.5	Polysomie 17	17
1.5.1	Tumorbiologische und pathologische Bedeutung im klinischen Setting	17
1.5.2	Therapie.....	19
1.6	Zielsetzung.....	24
2	UNTERSUCHUNG	27
2.1	Material und Methoden	27
2.1.1	Probenauswahl und Gewebskollektive.....	27
2.1.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	28
2.1.3	Design und Generierung der Hybridisierungssonden	29
2.1.4	Mikroskopie, FISH-Signalzählung und Dokumentation.....	30
2.1.5	Evaluation echter Polysomie 17	30
2.1.6	DNA-Extraktion und aCGH.....	31
2.1.7	aCGH-Rohdaten	32
2.2	Ergebnisse.....	33
2.2.1	Referenzbereiche	33
2.2.2	Markerzugewinne und -verluste.....	33
2.2.3	Markerzugewinne in Kombination.....	35
2.2.4	Betrachtung "echt" polysomer Fälle.....	37
2.2.5	Zentromerzugewinne.....	39

2.2.6	Zweifelhafte Fälle ("equivocals")	43
2.2.7	"Marker-Kombinations-Score"	44
2.2.8	aCGH-Daten.....	46
2.2.9	Chromosomenaberrationen im Überblick	52
2.2.10	Aneuploidie-Bestimmung mithilfe von Spec21, Spec13 und Cen18.....	53
2.2.11	Her2-Status von ASCO/CAP 2007/2013 im Vergleich	56
2.2.12	Her2-Status gemäß den 17p-Markern	58
2.3	Diskussion	60
2.3.1	Cen17-Amplifikation als häufige Ursache "polysomer" Tumoren	60
2.3.2	Eine "echte" Polysomie 17 als ein seltenes Ereignis.....	62
2.3.3	Evaluation der drei untersuchten 17p-Marker.....	64
2.3.4	Klassifizierungsveränderungen des Her2-Status.....	67
2.4	Zusammenfassung	71
3	ANHANG.....	73
3.1	Zu 1.1 Bedeutung einer Her2-Überexpression beim invasiven Mammakarzinom ...	73
3.2	Zu 1.4 Richtlinien für die pathologische Her2-Diagnostik	74
3.3	Zu 2.1.1 Probenauswahl und Gewebskollektive	77
3.4	Zu 2.1.3 Design und Generierung der Hybridisierungssonden	84
3.5	Zu 2.2.8 aCGH-Daten.....	86
3.6	Zu 2.2.11 Her2-Status von ASCO/CAP 2007/2013 im Vergleich	87
3.7	Zu 2.3 Diskussion	89
4	VERZEICHNISSE	91
4.1	Abkürzungen	91
4.2	Abbildungen	93
4.3	Tabellen	95
5	LITERATUR.....	96
6	DANKSAGUNG	107
7	LEBENS LAUF.....	108

1 Grundlagen zum Forschungsstand

1.1 Bedeutung einer Her2-Überexpression beim invasiven Mammakarzinom

Mit einer jährlich weltweiten Inzidenz von bis zu einer Million ist Brustkrebs die häufigste maligne Erkrankung von Frauen und umfasst 18% aller weiblichen Tumoren [1],[2]. Nach Lungenkrebs ist ein Mammakarzinom die zweithäufigste Krebsart weltweit (1,38 Millionen; 10,9% - Stand 2008) [3].

Eine zentrale Rolle in der Karzinogenese von Mammatumoren spielt Chromosom 17, eines der kleinsten Chromosomen mit der zweithöchsten Gendichte [4]. Darauf sind zahlreiche Gene lokalisiert, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von Brustkrebs stehen. Neben Onkogenen wie Her2, TOP2A und TAU sind auf dem Chromosom 17 unter anderem die Tumorsuppressorgene TP53, BRCA1 und HIC-1 sowie DNA-Reparaturgene wie RDM1 kodiert [5],[6] (siehe 3.1 im Anhang). CGH-("comparative genomic hybridization"), LOH-("loss of heterozygosity") und andere molekulargenetische Studien an Brusttumoren haben gezeigt, dass Chromosom 17 in mindestens 30% alteriert vorliegt [4]: So kommen häufig komplexe Muster genetischer Aberrationen vor [7],[8],[11], die vor allem den langen Arm (17q) und perizentrische Regionen betreffen [9],[10],[28]. Einige Autoren sprechen von einem "Feuersturmuster" ("firestorm pattern"), einem Muster aus nah aneinander liegenden Peaks von Kopienzahlzugewinnen, die z. B. mittels vergleichend-genomischer Hybridisierung (CGH-Analysen) abgebildet werden können [11],[12]. Der kurze Arm 17p ist dagegen häufig durch einen Verlust gekennzeichnet, weswegen Marker auf 17p oftmals deletiert vorliegen [8],[13],[14].

Besondere Aufmerksamkeit gilt dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2 ("human epidermal growth factor receptor 2" [15]), welcher von einer Region (17q12) auf dem langen Arm (17q12-21q32) von Chromosom 17 kodiert wird [16]. Her2 ist das am häufigsten amplifizierte Gen in Mammakarzinomen [17],[18]. Neben Her2, dessen Rolle 1987 das erste Mal in Verbindung mit Brustkrebs beschrieben wurde [19], existieren in der Literatur weitere synonym verwendete Abkürzungen wie ERBB2, NEU, NGL oder TKRI [20],[21],[18]. Das Her2-Gen kodiert einen 185 kDa-Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. Dieser Rezeptor stellt ein Protein der Typ 1 epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptorfamilie dar [21], welche die vier homologen Rezeptoren Her1

(ERBB1), Her2 (ERBB2), Her3 (ERBB3) und Her4 (ERBB4) beinhaltet. Diese sind in die Aktivierung von komplexen Signalwegen involviert und essentiell sowohl für Zellüberleben und -proliferation als auch für die Regulation von normalem Brustwachstum und normaler Mammaentwicklung [22],[23]. Während für Her1-, Her3- und Her4-Rezeptoren die jeweiligen Liganden bekannt sind, muss aufgrund der 3D-Konformation davon ausgegangen werden, dass an den Her2-Rezeptor kein natürlicher Ligand bindet [24]. Nachgewiesen ist jedoch, dass Her2 extensive, substantielle Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor EGFR ("epidermal growth factor receptor") zeigt [15]. Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Her2) ist in etwa 18% - 20% bei Brustkrebs überexprimiert [25],[18]. Diese Überexpression geht mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und herabgesetzter Lebenserwartung der Patienten einher [26].

Es gibt verschiedene, molekulare Mechanismen, die zu einer Her2-Protein-Überexpression führen können. Einige Autoren ziehen eine Genamplifikation als ursächlichen genetischen Mechanismus für eine Her2-Überexpression heran [25]: So zeigen laut Dowsett et al. 90% der Her2-überexprimierenden Brusttumoren fokale Zugewinne, die den Her2-Locus involvieren [27]. Die hohe Anfälligkeit für Aberrationen auf Chromosom 17 untersucht eine Studie von Orsetti et al.: Zahlreiche Loci auf Chromosom 17 werden von scharfen Übergängen begrenzt, welche ein Cluster kleiner Intervalle (0,2-2 Mb) bilden. Diese Übergänge stellen Bruchpunkte und damit fragile Orte für das Auftreten von Strangbrüchen dar. Nicht reparierte Doppelstrangbrüche sind initiale Momente für eine DNA-Amplifikation, woraus modifizierte Expressionsprofile resultieren können [28].

Daneben scheinen molekulare Abläufe auf Ebene der Transkription wie eine Hochregulation der mRNA oder posttranskriptionale Vorgänge wie alternatives Splicing eine Rolle zu spielen [26],[29],[30],[31].

Andere Prozesse, das posttranslationale Proteinlevel betreffend, sind eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine übermäßige Her2-Expression: Neben den Mechanismen auf DNA-Ebene könnten ein Recycling von Onkogenen sowie alterierte Proteindegradation und -ubiquitinierung die Expression beeinflussen [32]. Beispielsweise beschrieben Magnifico et al., dass eine Her2-Überexpression mit der Akkumulation von recycelten Onkoproteinen auf der Zelloberfläche zusammenhängt [33].

Ferner kann eine vergrößerte Gendosis - sekundär bedingt durch eine erhöhte Anzahl von Chromosom 17 (Polysomie) und unabhängig von einer Her2-Amplifikation - zu einer

erhöhten Her2-Proteinexpression beitragen [22],[34],[35]. So wurde in Studien deutlich, dass eine erhöhte Anzahl von Chromosom 17, angezeigt durch die Anzahl des Zentromer 17 (Cen17), mit einem höheren IHC-Score in Tumoren ohne zusätzliche Her2-Amplifikation einhergeht [6],[26],[36],[37],[41]. Dementsprechend fanden Hyun et al. eine signifikant höhere Inzidenz von vermehrten Cen17-Signalen (Polysomie, Cen17 > 2,25) in Tumoren mit IHC 2+/3+ als mit negativen IHC 0/1+ (40,8% versus 12,3%, n = 309) [38]. Auch bei Varshney et al. scheint Polysomie 17 mit erhöhten IHC-Scores zu korrelieren: 47% der polysomen Patienten (n = 690) wiesen einen 3+ IHC-Score auf [39]. Gleiches bestätigt eine Studie (n = 561) von Lal et al., in der höhere Her2- und Cen17-Zahlen mit IHC 3+/FISH-negativen Tumoren einhergehen [40].

Vor allem IHC 2+ Fälle werden mit Polysomie 17 in Verbindung gebracht [22],[26],[41],[42],[43]. Vanden Bempt et al. befanden 74,2% der polysomen, Her2-nicht-amplifizierten Tumoren (n = 62) als IHC 2+ [44]. Andere wiederum differenzieren zwischen niedriger und hoher Polysomie 17, in Abhängigkeit vom jeweiligen Fall unterscheidet sich die Her2-Proteinexpression deutlich [45].

Konträr dazu haben einige Autoren keinerlei Evidenz gefunden, wonach die Cen17-Anzahl in Verbindung mit einer Her2-Überexpression steht [26],[46]: Mit Studien von Dal Lago et al. (n = 584) und Downs-Kelly et al. (n = 56) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Her2-Expression zwischen Tumoren mit normaler und mit erhöhter Cen17-Anzahl (Cen17 > 2,25) gefunden werden [47],[48]. Jedoch wurde in keiner der Studien die Unterscheidung zwischen einer "echten" Polysomie 17 und lediglich einer Cen17-(Ko-)Amplifikation getroffen.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Evidenzbilanz, dass eine erhöhte Cen17-Zahl im Sinne einer Polysomie 17 neben der Her2-Überexpression eine tumorbiologische Bedeutung hat, vor allem in Tumoren mit IHC 2+ Scores [26].

Welcher Mechanismus jedoch genau zu einer Überexpression bei Polysomie führt, bleibt ungeklärt. Die Annahme, dass Polysomie 17 eine Hochregulation der mRNA bewirkt, ist von einigen widerlegt worden [31],[49],[44],[47],[48], was suggeriert, dass es auch einen posttranslationalen Mechanismus für einen erhöhten Her2-Rezeptorgehalt bei Polysomie 17 gibt [48]. Auf der Grundlage dieser zahlreichen Expressionsmechanismen nehmen Hanna et al. an, dass die Regulation von Her2-Expression zwischen Fällen, die eine Her2-Amplifikation, segmentale Her2/Cen17-Koamplifikationen oder "echte" Polysomie 17 zeigen, differiert. Der biologische Einfluss solcher Veränderungen in genomischer Organisation

scheint heterogen zu sein, im Einklang mit konträren Berichten zur Korrelation zwischen apparenter Chromosom 17-Polysomie und Her2-Überexpression.

Weitere Untersuchungen zum Her2-Locus und dessen Expressionsprofil hinsichtlich des mRNA- und Protein-Level scheinen unumgänglich, um die Expressionsmechanismen ursächlich identifizieren und therapeutisch effektiv bekämpfen zu können [26].

1.2 Anti-Her2 Therapie beim Her2-positiven Mammakarzinom

Der Her2-Rezeptor weist eine extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Alphahelix- und eine intrazelluläre Proteinkinase-Domäne auf.

Die extrazelluläre Domäne ist in vier weitere Bereiche unterteilt: Wichtig sind dabei Domäne I für die Bindung des Liganden, Domäne II für die Dimerisierung und Domäne IV als Rezeptor für den humanisierten, monoklonalen Antikörper Trastuzumab [50].

Trastuzumab (Herceptin, Genentech, South San Francisco, CA) ist etablierter Standard als alleinige oder in Verbindung mit Chemotherapie durchgeführte Behandlung von Tumoren mit Her2-Überexpression [26]. Neben einer Inhibition der Tumorzellproliferation und einer rein zellulär ausgelösten Apoptose dürfte die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität entscheidend für den Hauptwirkmechanismus von Trastuzumab sein. Auf zellulär-molekularer Ebene spielt für die anti-tumorigene Wirkung die Down-Regulation des PI3I/Akt-Signalwegs eine Rolle [50]. Bei zusätzlicher Chemotherapie verbessert der Antikörper, der seit 1998 von der FDA für die Therapie von Her2-amplifizierten Tumoren eingesetzt wird, das Therapieansprechen, verzögert die Tumorprogression und verlängert das Gesamtüberleben [18]. Das Todesrisiko wird um 30% - 40% in adjuvantem Setting bei Brustkrebs im frühen Stadium herabgesetzt [30]. Frauen mit Her2-positiven Tumoren, die Trastuzumab erhalten, haben eine bessere Prognose, verglichen mit denjenigen, deren Tumoren Her2-negativ sind [51]. Eine adjuvante Therapie mit Herceptin dauert in der Regel 12 Monate, wobei sich der Kostenumfang einer einjährigen Therapie auf rund 100000 Dollar beläuft. Es darf nicht unerwähnt bleiben, dass ein signifikanter Anteil Her2-positiver Mammakarzinome primär nicht auf eine Trastuzumab-Therapie anspricht [23]. Ferner entwickeln circa 10% - 15% der Frauen nach einem Jahr Therapie eine Resistenz gegenüber diesem Antikörper [50]. Es gibt einen erheblichen Anteil an sog. *de-novo* und akquirierten Resistenzen. Für die ursächlichen Resistenzmechanismen werden zahlreiche Mechanismen wie beispielsweise der extrazelluläre, trunkierte Her2-Rezeptor, der Verlust des Tumorsuppressors PTEN, die Aktivierung alternativer Signalwege (z. B. IGFR) oder die Übernahme der Signalweiterleitung durch andere Rezeptoren diskutiert. Die Strategieentwicklung zur Aufhebung der Resistenzmechanismen stellt einen wichtigen Aspekt bei der Behandlung des Her2-amplifizierten Mammakarzinoms dar [23] und ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Als Nachteil der Antikörpertherapie mit Herceptin gilt die kardiale Toxizität: 5% - 15% der Patienten entwickeln eine kardiale Dysfunktion und 1% - 4% signifikante kardiale Einschränkungen [18].

Eine auftretende Resistenz gegen Trastuzumab bildet die Basis für das Hinzuziehen zusätzlicher Therapeutika wie Lapatinib, Neratinib, Afatinib, Trastuzumab emtansine (bekannt als Trastuzumab-DM1), Hitzeschockprotein 90, Histondeacetylaseinhibitoren und Pertuzumab [21],[50],[52],[55],[26]. Sowohl die intrazellulären, dualen Tyrosinkinaseinhibitoren Lapatinib, Afatinib und Neratinib [53],[54] als auch Pertuzumab haben Effektivität bei Her2-positiven Brusttumoren gezeigt. Bei Pertuzumab handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen Antikörper, der anders als Trastuzumab an die eher exponierte extrazelluläre Domäne II des Her2-Rezeptors bindet [50].

Neben speziell gegen Her2-gerichtete Therapie nimmt der Her2-Status offensichtlich auch Einfluss auf einige systemische Therapien: So scheint Her2-Positivität mit einer Sensitivität für Anthracyclin-basierte Chemotherapie [55] und mit einer relativen, nicht absoluten Resistenz für endokrine Therapien einherzugehen [39],[55].

1.3 Möglichkeiten der pathologischen Her2-Diagnostik

Da der Her2-Status der einzige Marker ist, der eine Her2-gerichtete Therapie indizieren kann, ist eine präzise Her2-Diagnostik ein essentieller Schritt für die Behandlung von Brustkrebs [18]. Für die klinisch-diagnostische Praxis bilden zwei Techniken den Goldstandard: die Immunhistochemie (IHC) und die in-situ-Hybridisierung (ISH). Während in der IHC ein Antikörper eingesetzt wird, um die Intensität und prozentuale Verteilung der Her2-Proteinexpression zu evaluieren, wird bei der ISH die Her2-Genamplifikation auf DNA-Ebene untersucht [26]. Die nachfolgende Tabelle enthält einige Test-Kits, welche von der FDA ("US Food and Drug Administration") geprüft und sowohl für IHC als auch für ISH für die Bestimmung des Her2-Status zugelassen wurden (Stand 2014). Die Darstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Assay type	Trade name	Manufacturer	Date of FDA approval
Semi-quantitative IHC	HercepTest™	DAKO	September 1998
IHC	PATHWAY®	Ventana Medical Systems Inc	November 2000
IHC	InSite®	Biogenex Laboratories Inc	December 2004
Semi-quantitative IHC	Bond Oracle™	Leica Biosystems	April 2012
FISH	PathVysion®	Abbott Molecular Inc	December 2001
FISH	PharmDx™ Kit	DAKO	May 2005
CISH	SPoT-Light®	Life Technologies Inc	July 2008
CISH	INFORM HER2 dual ISH DNA probe cocktail	Ventana Medical Systems Inc	June 2011
CISH	PharmDx™	DAKO	November 2011

Tabelle 1: FDA-geprüfte Test-Kits für Her2-Diagnostik [25]

1.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Für die Bestimmung des IHC-Scores existieren geprüfte Kits, deren Antikörper alle gegen Her2 gerichtet sind: Im HercepTest (HercepTest, DAKO, Carpinteria, CA) ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, im Pathway Test (Ventana Medical Systems Inc, Trucson, AZ) ebenfalls ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper und im Bond Oracle Test (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) ein Maus-Antikörper (CB11) [21]. IHC wird standardmäßig auf Formalin-fixierten-Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten (FFPEs) durchgeführt [47], ist relativ schnell und kostengünstig durchzuführen [39] und erlaubt eine parallele Evaluation morphologischer Eigenschaften des jeweiligen Gewebes [21].

Grundsätzliches Problem von IHC ist das subjektive Auswerten und die damit einhergehende Interpretation der Färbeintensität [39]. Die Subjektivität kann beispielsweise durch einen Bildanalysator ACIS ("The Automated Cellular Imaging System; ChromaVision Medical

Systems, Inc., San Juan Capistrano, CA) reduziert werden [56]. Problematisch ist zudem, dass abhängig davon, welches IHC-Kit zum Einsatz kommt und wie lange der Antigen-Antikörper-Komplex der verschiedenen Antikörper in Formalin-fixierten Tumorgeweben überdauert [57], diskrepante Ergebnisse auftreten können [30],[47].

1.3.2 In-situ-Hybridisierung (ISH)

ISH kann sowohl an frisch gefrorenem Tumormaterial als auch an FFPE-Tumormaterial durchgeführt werden [58], ist jedoch im Vergleich zur quantitativ digitalen IHC-Analyse kostenaufwendig (> 300 US Dollar pro Fall) und zeitintensiv [2]. Außerdem ist die Technik nicht in jedem diagnostischen Labor verfügbar. Für ISH kann DNA entweder an ein Silber-Detektionssystem (SISH), an ein fluoreszentes (FISH) oder chromogenes (CISH) gekoppelt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Kombination aus CISH- und SISH-Systemen (BDISH: "bright-field double ISH") oder eine DDISH ("dual-hapten, dual-color ISH") dar [26]. Für ISH kann entweder eine Einzelsonde für die alleinige Bestimmung der absoluten Her2-Genkopienzahl oder eine Dual-Sonde verwendet werden, die zusätzlich Auskunft über die perizentrische Region Cen17 gibt [26]. Während PathVysion und PharmDx Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) jeweils duale Hybridisierungssonden für FISH darstellen, evaluiert Inform Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Ariz) ausschließlich die absolute Her2-Genkopienzahl [41],[57]. Um die Genauigkeit von FISH-Ergebnissen zu verbessern, empfehlen Jiang et al. die Analyse kompletter Zellkerne (WNFISH: "whole nuclei"-FISH) [59].

Ein Großteil der wissenschaftlichen Literatur erachtet einen quantitativen Bezugspunkt für die Her2-Genzahl in ISH-Untersuchungen und so ein zusätzliches Gen als Referenzwert für die Häufigkeit von Chromosom 17 als notwendig [44],[55]. So wird in ISH-Untersuchungen (mittlere Schnittdicke 4µm) immer wieder nur ein Bruchteil des Kerns (> 6 µm) betrachtet. Deshalb plädiert die Mehrheit der Autoren für die Verwendung von Zwei-Marker Sonden, um ein weiteres Gen von Chromosom 17 hinzuzuziehen und so den möglichen Schnittverlust zu korrigieren [55],[57],[60]. Diese Zwei-Marker Sonden untersuchen neben dem Genlocus von Her2 das Zentromer und perizentrische Regionen von Chromosom 17 (Cen17: 17p11.1-17q11.1). Daraus kann eine Her2/Cen17 Ratio gebildet werden, welche möglicherweise einen besseren Aufschluss über den Her2-Status gibt als eine Her2-Einzelsonde. Die Zahl der Cen17-Signale wird dabei als Surrogat für die Häufigkeit von Chromosom 17 angesehen und demnach zeigt eine Vermehrung von Cen17 über eine festgelegte Schwellgrenze eine

Polysomie an [55]. Damit ermöglicht Cen17 eine Aussage über eine eventuelle chromosomale Aneuploidie. Zusätzlich können durch die Verwendung der Ratio Duplikationen, die während der G2-Phase des Zellzyklus auftreten, ausgeglichen und die der G2-Phase geschuldeten, erhöhten Genkopienzahlen einkalkuliert werden [55]. Ins Verhältnis gesetzt zu Her2 können so neben dem mitotischen Zustand der Tumorzelle die Schnittdicke und der Anschnitt des Zellkerns berücksichtigt werden [26].

Gleichzeitig gibt es Befürworter der ausschließlichen Verwendung von Ein-Marker ISH, welche lediglich die absolute Her2-Kopienzahl pro Zellkern bestimmt. Tumoren mit vergrößerter Anzahl von Cen17 und ein wenig erhöhter Her2-Zahl werden möglicherweise von einer Ein-Marker ISH-Sonde als amplifiziert und vom Ratiowert einer Zwei-Marker ISH-Sonde als nicht-amplifiziert klassifiziert, da die erhöhte Cen17-Zahl die Ratio erniedrigt ($< 2,0$). Watters et al. schätzen diesen Umstand auf 2% - 9% aller Brusttumoren [61]. Lal et al. fanden in 3,9% (89/2279) differierende Ergebnisse, die der Verwendung der jeweils anderen Methode geschuldet waren [62]. Demnach gibt es mit einem Zwei-Marker System aufgrund erhöhter Cen17-Zahlen negativ klassifizierte Fälle, die mit einem Ein-Marker System positiv gewertet werden würden [40].

Im Kontext seltener Polysomie 17 und häufiger Cen17-Koamplifikationen mag eine alleinige Betrachtung der Her2-Zahl zu adäquateren Therapieentscheidungen führen als die Verwendung von Ratiowerten aus Zwei-Marker Sonden, die eine mögliche Her2-Amplifikation bei erhöhter Cen17-Anzahl kaschieren. Eine Studie von Dekker et al. ($n = 971$), in der eine hohe Konkordanz zwischen IHC und Ein-Marker SISH (98,3%) festzustellen war, empfiehlt die alleinige Betrachtung der Her2-Signale für Fälle mit erhöhter Cen17-Zahl: Vor allem bei Tumoren, bei denen Ein-Marker ISH versus Zwei-Marker ISH zu verschiedenen Ergebnissen führte, korrelierte die absolute Her2-Zahl mehr mit dem IHC-Score als der Ratiowert der Zwei-Marker Hybridisierungssonde [53]. Auch Marchio et al. plädieren für eine singuläre Auswertung der Her2-Kopienzahl: Zu beobachten war eine auffallend deckungsgleiche Übereinstimmung zwischen Ergebnissen der Ein-Marker Sonde und aCGH-Analysen [7].

Vor dem Hintergrund der Zwei- versus Ein-Marker Problematik bzw. der absoluten Her2-Kopienzahl und dem Ratiowert Her2/Cen17 hinterfragen einige Autoren FISH als die von der ASCO/CAP favorisierte Methode unter den ISH-Detektionssystemen kritisch und plädieren für die Verwendung von CISH anstatt FISH [58],[38], da bei CISH generell nur mehr die absolute Her2-Genzahl gezählt wird, obwohl auch Zwei-Marker CISH-Sonden auf dem Markt

sind und zum Einsatz kommen [38]. Nicht nur Isola et al. schlagen CISH als akkurate und praktischere Alternative für FISH in der klinischen Her2-Diagnostik vor [58], sondern auch Hyun schreibt CISH ein großes Potential für die Integration in diagnostische Labore zu. Neben der absoluten Her2-Zahl kann bei CISH gleichzeitig die Histologie der Gewebe beurteilt werden und das Signal bleibt lange stabil, was eine Reevaluation und Lagerung ermöglicht. Während FISH ein modernes Epifluoreszenzmikroskop mit speziellen Fluoreszenzfiltern erfordert, benutzt CISH eine Peroxidasereaktion für die chromogene Detektion von Diaminobenzidinen und kann mittels eines einfachen Lichtmikroskops evaluiert werden [58]. Momentan empfehlen die aktuellen Richtlinien der ASCO/CAP eine Her2-Testung mit IHC oder FISH, bei zweifelhaften Fällen stellt CISH eine mögliche Alternative zu FISH dar [21]. Generell wird im Zweifelsfall von der ASCO/CAP ein Reflex-Testen empfohlen, das entweder eine alternative Technik und/oder die Analyse alternativer Marker beinhaltet (siehe Abschnitt 2.4).

1.3.3 Andere diagnostische Möglichkeiten

ISH und IHC sind problematisch wegen der kritischen intra- und interlaboratorischen Reproduzierbarkeit, beispielsweise aufgrund von variablen Fixationszeiten der Präparate [52]. Die ASCO/CAP schätzt, dass circa 20% des Her2-Testens aufgrund zahlreicher präanalytischer, postanalytischer und analytischer Variablen inakkurat sind [18].

Für die klinische Routinediagnostik sind darum neben den in den ASCO/CAP-Richtlinien empfohlenen Untersuchungsmethoden weitere Möglichkeiten für die Messung des Her2-Status interessant. Array-basierte CGH (aCGH) ist eine exakte und objektive DNA-basierte Alternative, die hohen Durchsatz und Auflösung garantiert, eine genomweite Kopienzahlanalyse in einem einzigen Test ermöglicht und bereits Standard bei der Detektion kongenitaler, genomischer Abnormalitäten ist. Dass eine hohe Übereinstimmungsrate dieser Technik mit den bisher gültigen Methoden besteht, bestätigt eine Studie von Yeh et al. (n = 97), in der 97% der mit aCGH-analysierten Tumoren konkordante Ergebnisse mit IHC und FISH zeigten [52]. In einer Studie von Gunn et al. konnte der zuvor weder mit IHC noch ISH identifizierbare Her2-Status für alle 20 Tumoren mithilfe einer aCGH detektiert werden [63]. CGH ist jedoch kostenaufwendig und erfordert ein im Umgang mit großer Datenkomplexität geschultes Personal [8].

RT-PCR ("real-time polymerase chain reaction") wie MLPA stellt eine weitere Technik für die Her2-Diagnostik dar. Voraussetzung ist jedoch der vorhergehende Ausschluss von

Tumorheterogenität mithilfe von ISH [64], da eine RNA-Extraktion aus Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen den Einfluss der Tumorzellen auf das Ergebnis reduziert [21].

Ferner kann die Messung von Her2-Totalproteinexpression und Her2-Homodimeren (HERMark; Monogram Biosciences) zur Bestimmung des Her2-Status herangezogen werden [20].

Auch eine Serumtestung könnte zukünftig, sofern ein zuverlässiger Test entwickelt wird, die Determination vereinfachen. Potentielle Testkandidaten sind sHer2-ECD (lösliches Her2-extrazelluläre Domäne) und Her2 in zirkulierenden Tumorzellen (CTCs). Level von sHer2-ECD könnten mittels eines ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") im Serum genau quantifiziert werden [21].

1.4 Richtlinien für die pathologische Her2-Diagnostik

Richtlinien für die Her2-Testung wurden erstmals publiziert von der FDA und später von der ASCO/CAP. Die FDA definierte Konditionen für die Kategorien Her2-negativ und Her2-positiv:

Für Her2-Positivität wurde für ISH-Untersuchungen eine Her2/Cen17 Ratio von 2,0 als Schwellenwert für die Zwei-Marker Sonde PathVysion und eine Her2-Kopienzahl $> 4,0$ als *cutoff* für die Ein-Marker Sonde INFORM etabliert. Her2-Kopienzahlen $< 4,0$ und eine Her2/Cen17 Ratio $< 2,0$ werden als Her2-negativ gewertet.

Die IHC wird nach einem festgelegten Schema durch einen Wert von 0 bis 3+ ausgedrückt. Eine IHC 3+ stellt die Voraussetzung für eine anti-Her2 Therapie dar und wird als positiv gewertet, wenn eine intensive, circumferente Immunfärbung in $> 10\%$ (HercepTest, Dako, Denmark) der Tumorzellen vorhanden ist.

Im Jahr 2007 publizierte ASCO/CAP Empfehlungen, die eine Her2/Cen17 Ratio von $> 2,2$ als positiv werteten und erstmals für sogenannte Her2-zweifelhafte Fälle eine Ratio-Spanne von 1,8-2,2 und eine Her2-Kopienzahl von 4,0-6,0 einführten [65].

Zusätzlich wurde der Wert für IHC-Positivität von 10% auf eine intensive, circumferente Immunfärbung in mindestens 30% erhöht [66].

Im Jahr 2013 wurden die ASCO/CAP-Richtlinien zur Her2-Diagnostik aktualisiert: Diese reduzieren die Her2/Cen17 Ratio von 2,2 auf den ursprünglich von der FDA empfohlenen Wert 2,0 für Zwei-Marker ISH. Gleichzeitig schaffen die aktuellen Richtlinien die Ratio-Spanne 1,8-2,2 unter 2007 für zweifelhafte Fälle ab. Der durchschnittlichen Her2-Genzahl/Zellkern kommt neuerdings genauso viel Gewichtung in der Interpretation von Zwei-Marker ISH zu wie der Ratio.

Die Her2-Genzahl/Zellkern war bereits Bestandteil des Leitfadens von 2007, jedoch ausschließlich für die Dateninterpretation bei der Verwendung von Ein-Marker ISH-Sonden vorgesehen und nicht Teil der Zwei-Marker ISH-Routinediagnostik.

Aktuell werden alle Fälle mit einer Ratio $\geq 2,0$ als positiv gewertet - Fälle $< 2,0$ werden dann als positiv gewertet, wenn die Her2/Nucleus-Zahl $\geq 6,0$ ist -, als zweifelhaft, wenn die Her2/Nucleus-Zahl zwischen 4,0-6,0 liegt, und als negativ, wenn die Her2/Nucleus-Zahl $< 4,0$ ist [67]. Eine IHC von 0 oder +1 klassifiziert einen negativen Fall, bei einer IHC von 2+ ist der Fall zweifelhaft und von 3+ positiv. Voraussetzung für ein Her2-positives Ergebnis ist, wie ursprünglich von der FDA festgesetzt, dass mindestens 10% des Tumorgewebes homogen und direkt aneinander liegend sind und wenigstens 20 Zellen innerhalb dieses Bereiches

gezählt werden [26]. Der Leitfaden von 2013 ist an dieser Stelle aufgrund seiner Detailgenauigkeit nicht vollständig aufgeschlüsselt, im Anhang findet sich die detaillierte Übersicht (Abschnitt 3.2).

Aktuelle Vorschriften zur **IHC**-Testung:

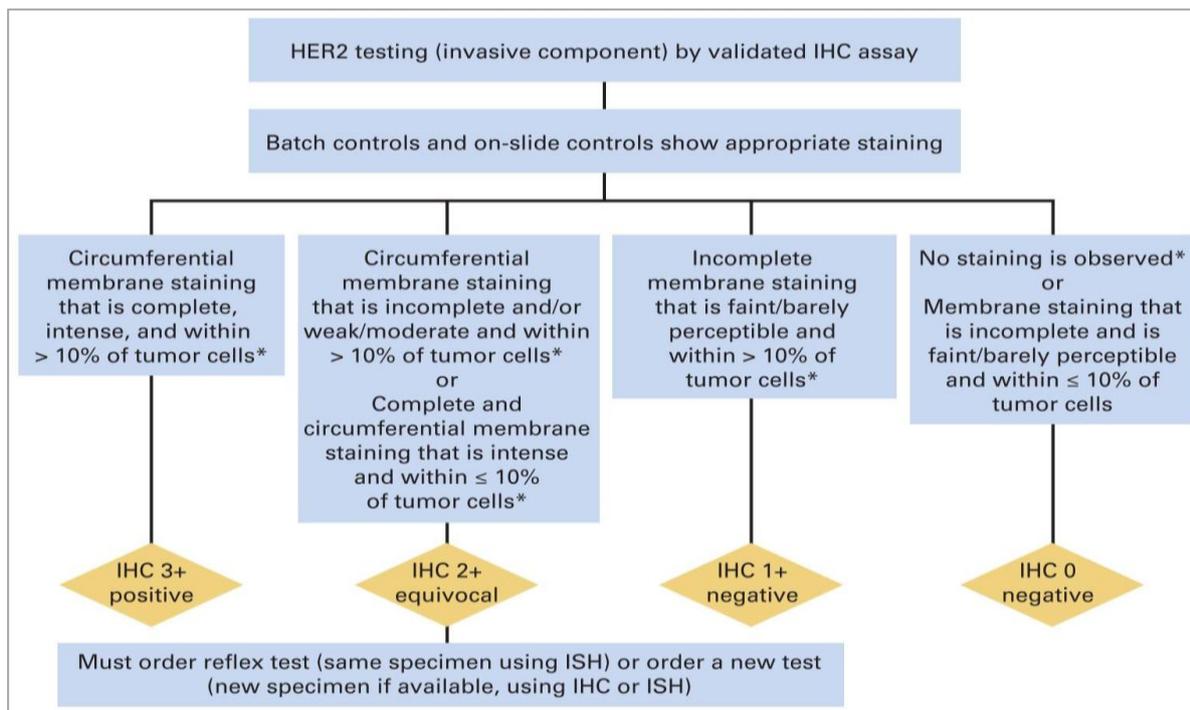


Abbildung 1: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) zur Her2-Diagnostik mit IHC [78]

Aktuelle Empfehlungen für die Bestimmung des Her2-Status bei **ISH**-Untersuchungen:

Guideline	Method	AMP/POSITIVE	EQUIVOCAL	NOT AMP/NEGATIVE
FDA/	HER2/CEP17 ratio	≥2	—	<2
	HER2 copy number	>4	—	≤4
ASCO/CAP 2007	HER2/CEP17 ratio	>2.2	1.8–2.2	<1.8
	HER2 copy number	>6	4–6	<4
ASCO/CAP 2013	ISH algorithm	(a) HER2/CEP17 ratio ≥2, regardless of HER2 copy number	HER2/CEP17 <2 with HER2 copy number ≥4 and <6	HER2/CEP17 <2 with HER2 copy number <4
		(b) HER2/CEP17 <2 but HER2 copy number ≥6		
ASCO/CAP 2013	HER2 copy number	≥6	≥4 and <6	<4

Tabelle 2: Richtlinien zur ISH-Her2-Diagnostik von ASCO/CAP (2007/2013) und FDA [76]

AMP: Her2-amplifiziert NOT AMP: nicht Her2-amplifiziert

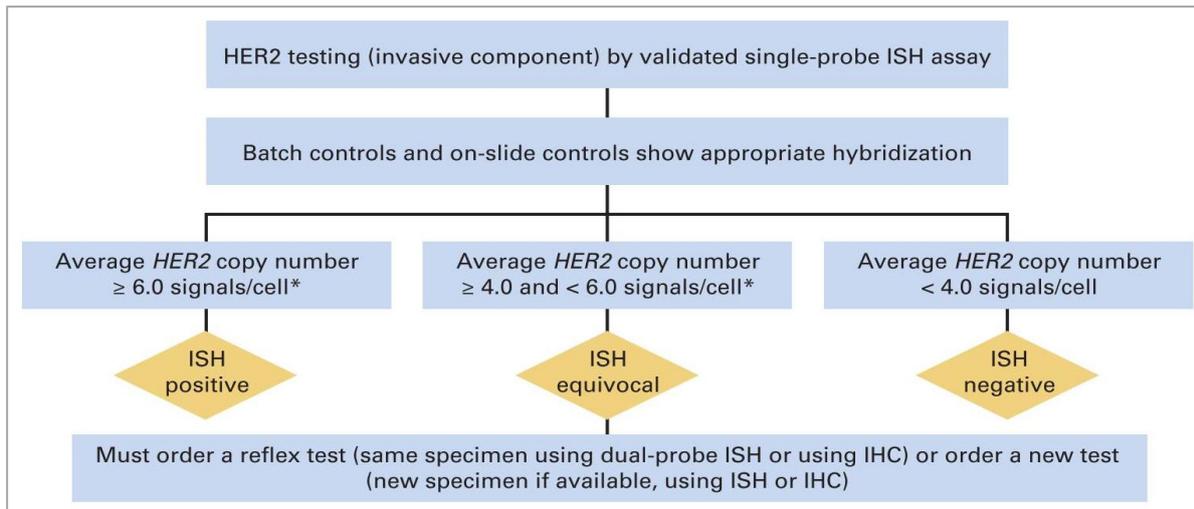


Abbildung 2: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) für Her2-Diagnostik mit Ein-Marker ISH [78]

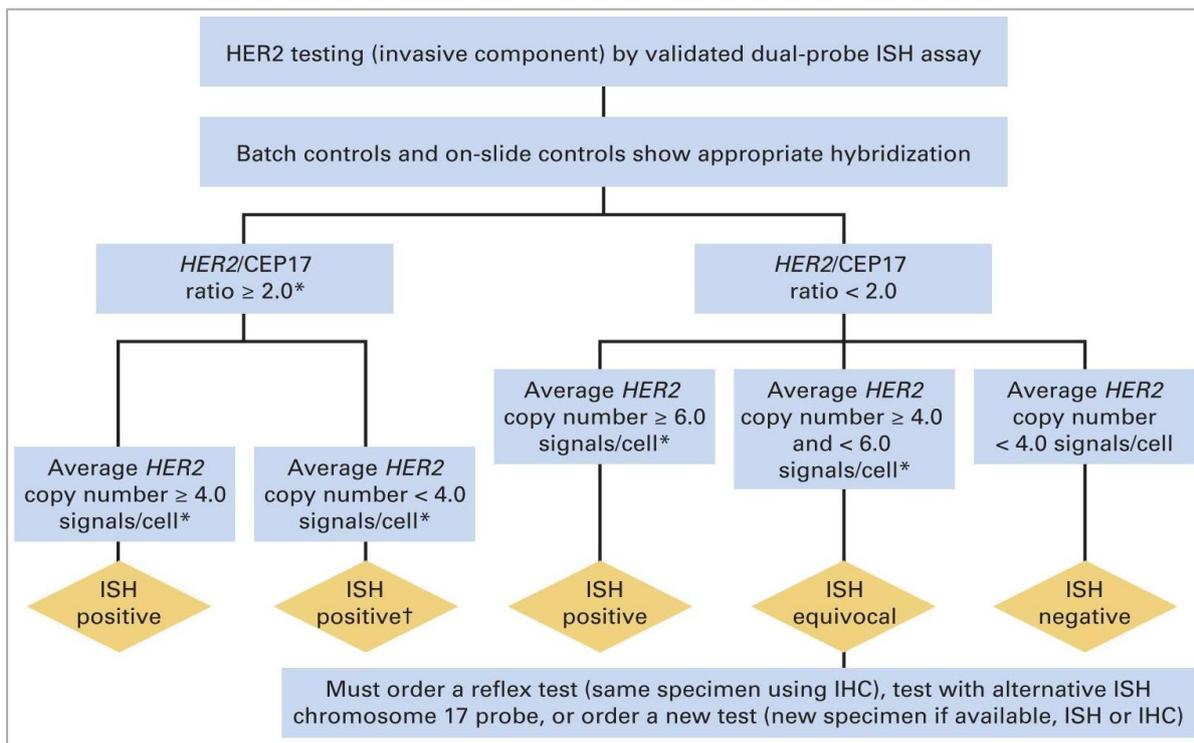


Abbildung 3: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) für Her2-Diagnostik mit Zwei-Marker ISH [78]

Sowohl IHC als auch ISH können jeweils als primäre Tests durchgeführt werden. Dabei weisen die Richtlinien keiner Diagnostik Priorität zu. Liefert der erste durchgeführte Test ein zweifelhaftes Ergebnis, so muss ein Reflex-Test durchgeführt werden. Dieser Reflex-Test muss entweder auf demselben Gewebe mit der jeweils anderen Methode (IHC oder ISH) erfolgen - alternativ ist auf einer neuen Gewebeprobe einer der beiden Tests durchzuführen [26] - oder es wird für dasselbe Gewebe ein alternativer ISH-Marker hinzugezogen [42],[66].

Weiterhin sollte ein Reflex-Test angeschlossen werden, wenn die Ergebnisse diskordant mit anderen histopathologischen Befunden sind. Liegt weder ein zweifelhafter Fall noch eine Uneinigkeit mit histopathologischen Befunden vor, reicht es, entweder eine ISH oder IHC durchzuführen. Einige Labore bevorzugen ISH mit dem Argument, die Genauigkeit von IHC sei limitiert durch technische Begebenheiten und inhärente Subjektivität bei der Auswertung [26]. In den USA hingegen wird zumeist (fast 80%) mit einem IHC-Screening begonnen. Nur Fälle mit IHC 2+ werden mit einer ISH betrachtet [42]. Auch Swanson et al. plädieren für IHC als ersten durchgeführten Test: Dies sei eine geeignete Strategie, zweifelhafte Fälle zu minimieren und erst an IHC 2+ Fälle einen Reflex-ISH anzuschließen, da eine primäre ISH weit mehr zweifelhafte Fälle identifizieren würde [68].

Zweifelhaft eingestufte Fälle stellen aufgrund mangelnder Therapievorgaben ein Problem in der onkologischen Praxis dar, weil ein solcher Befund nicht hinweisgebend für eine Therapieentscheidung ist. Aus diesem Grund wird eine möglichst geringe Anzahl an zweifelhaften Fällen angestrebt. Eine Reduktion der zweifelhaften Fälle durch eine IHC-Testung findet sich bei Muller et al.: 21 zweifelhafte Fälle wurden mittels ISH identifiziert, von denen sich durch ein anschließendes Reflex-Testen mit IHC nur 67% (14/21) als zweifelhaft herausstellten [20]. Minot et al. berichten von einer weiteren Reduktion zweifelhafter IHC-Ergebnisse durch die Verwendung quantitativ digitaler Analysen, was zudem die Anzahl der Reflex-ISH-Tests minimieren würde [69].

Schwierig für die klinische Diagnostik sind vor allem jene Fälle, die eine deutliche Diskordanz von ISH und IHC zeigen. Eine komplexe Tumorbilogie wie Aneuploidie von Chromosom 17 und intra-tumorale Heterogenität können dafür verantwortlich sein und erschwerend auf die Her2-Diagnostik wirken [26],[70]. Die Beobachtung, dass innerhalb eines Tumors zytogenetisch unterschiedliche Zellklone zu finden sind, wird als Tumorheterogenität bezeichnet. Der Nachweis von Heterogenität ist Ausdruck des Nebeneinanders verschiedener Zellklone mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen [71]. Differenzen bezüglich Her2-Genamplifikation und Her2-Proteinexpression können von Zelle zu Zelle in einer Spanne von 1% - 50% variieren, abhängig von den angewandten diagnostischen Methoden. Die Präsenz von Her2-Heterogenität kann zu niedrigen Konkordanzraten (25%) zwischen IHC und ISH führen und verkompliziert die Behandlung mit Her2-gerichteter Therapie [21],[72].

Neben Tumorheterogenität kann Polysomie als Ursache für Diskrepanzen zwischen ISH und IHC herangezogen werden [36],[40],[56]. Insbesondere bei IHC 2+ Fällen unterscheiden sich

IHC und ISH vielfach, wofür einige Autoren Polysomie 17 verantwortlich machen: So zeigen IHC 2+ Fälle häufig eine Her2-Proteinexpression, die nicht durch eine Her2-Genamplifikation, sondern Polysomie 17 bedingt ist [22],[41],[49]. Inwieweit eine vergrößerte Cen17-Zahl (Polysomie 17) in die diagnostische Her2-Interpretation einfließen soll, ist umstritten. Hanna et al. schlagen folgenden Umgang mit Polysomie 17 für die Her2-Diagnostik vor:

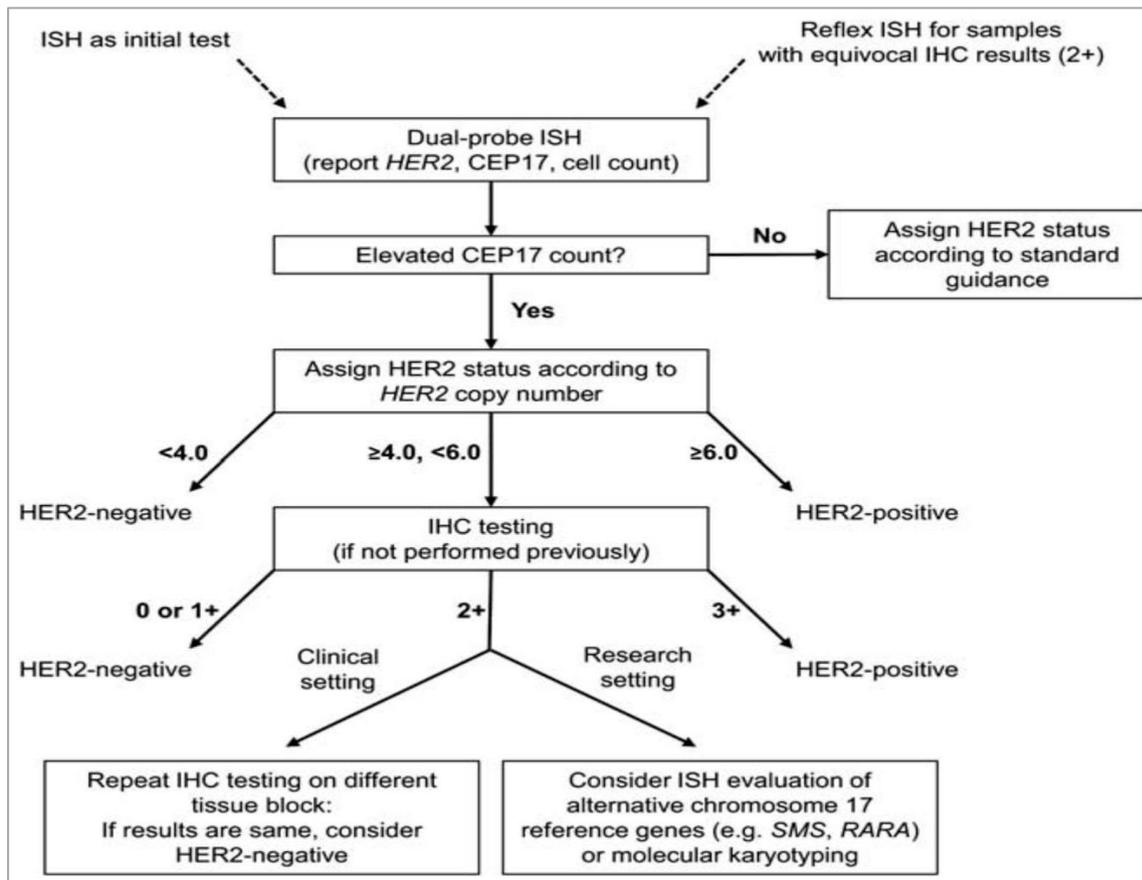


Abbildung 4: Algorithmus für die Bestimmung des Her2-Status bei Polysomie 17 [30]

Laut Hanna et al. soll bei erhöhter Cen17-Anzahl allein die absolute Her2/Nucleus-Zahl betrachtet werden. Die Vorgehensweise ist somit identisch zur Ein-Marker ISH-Diagnostik. Fällt die Her2/Nucleus-Zahl in die zweifelhafte Spanne von 4,0-6,0, ist eine IHC - falls noch ausstehend - durchzuführen. Führt diese wiederum zu einem zweifelhaften Ergebnis, schließt sich ein Reflex-Testen an [26].

Für die Untersuchung bezüglich ISH und IHC diskordanter Fälle und ungelöster IHC 2+ Fälle erachten Gunn et al. die Integration einer aCGH als notwendig [63].

1.5 Polysomie 17

Eine oder mehrere zusätzliche Kopien des gesamten Chromosoms 17 definieren eine Polysomie 17. Dies impliziert eine entsprechend direkt proportionale Vermehrung aller kodierenden und nicht-kodierenden Regionen. Die Effekte von Polysomie 17 auf die Her2-Expression, die Prognose der Erkrankung und auf andere klinisch-pathologische Variablen, deren Kenntnis für eine adäquate Behandlung notwendig wären, sind weitgehend unklar. Aktuell gibt es keinen Konsens darüber, wie Polysomie 17 in die Her2-Interpretation einfließen soll [26] und ab wann von einer Polysomie gesprochen wird [18]. Das Zentromer 17 (Cen17) wird als Referenzwert im Sinne von "pars pro toto" für die Häufigkeit von Chromosom 17 verwendet, eine Vermehrung über den festgesetzten Schwellenwert von ≥ 3 zeigt eine Polysomie 17 an [55].

Eine benigne, diploide Zelle besitzt in der Regel zwei Chromosomen 17 und damit zwei Cen17-Signale. Praktisch zeigen jedoch selbst gesunde, diploide Zellen gelegentlich Abweichungen vom Wert 2,0, beispielsweise durch Schnittartefakte, die Präsenz von G2-Zellen oder chromosomale Instabilität [26].

Drei oder mehr Cen17-Signale im Tumorzellkern suggerieren eine Aneuploidie von Chromosom 17. In der Literatur weicht der *cutoff* für Cen17 von der ganzen Zahl 3,0 jedoch häufig ab. Dies ist u.a. der Tumorheterogenität geschuldet, die eine Berechnung des Cen17-Schwellenwerts aufgrund unterschiedlicher Genkopienzahlen innerhalb des Tumors erschwert [55]. Je nachdem welcher *cutoff* für Cen17 festgelegt wird, variiert die Häufigkeit detektierter Alterationen der Zentromer 17-Region bzw. Polysomie 17 stark [26],[55].

In der vorliegenden Studie zeigen Cen17-Signale $> 2,24$ einen Zugewinn der Zentromer-Region an.

1.5.1 Tumorbioologische und pathologische Bedeutung im klinischen Setting

Ob Polysomie 17 möglicherweise einen prognostischen Parameter für die veränderte Expression der wachstumsregulierenden Gene/Proteine von Chromosom 17 darstellt [26] und damit Einfluss auf den Krankheitsverlauf bzw. das Therapieansprechen nimmt, ist schwierig zu entscheiden.

Nach gegenwärtigem Stand lässt sich Folgendes zusammenfassen: In einer prospektiven Analyse, beschränkt auf IHC 2+/3+ Tumoren (n = 147), wurde eine signifikante Assoziation zwischen vergrößerter Cen17-Zahl (Cen17 $> 3,0$) und Lymphknotenpositivität manifest. Ein

Zusammenhang mit histologischem Grading und Hormonrezeptorstatus zeigte sich jedoch nicht [22]. Lü et al. fanden eine Korrelation von polysomen Tumoren (n = 52) mit höheren nukleären Atypien und lymphogenen Metastasen [73]. Auch bei Orsaria et al. gingen polysome Tumoren (n = 63) mit einem aggressiven Tumorphänotyp wie vergrößerter Tumorausdehnung (pT4), erhöhtem NPI ("Nottingham Prognostic Index") und histologischem Grading einher [35]. Weiterhin steht Polysomie 17 möglicherweise in Zusammenhang mit Progesteron-Rezeptor negativen Tumoren [35],[74]. Bei Ji et al. zeigten Patienten mit Tumoren mit Cen17-Zugewinn (n = 184) ein DFS ("disease free survival"), das zwischen dem DFS von Her2-negativen und Her2-positiven Patienten lag [45]. Andere Studien belegen, dass eine erhöhte Cen17-Anzahl keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten hat, obgleich offensichtlich ein Trend zu größeren Rückfallquoten bei polysomen Tumoren zu verzeichnen ist [22],[61],[75]. Erhöhte Cen17-Zahlen scheinen in Abwesenheit einer spezifischen Her2-Amplifikation mit einem aggressiven Phänotyp einherzugehen [26],[35],[73]. Krishnamurti et al. verglichen 35 nicht-polysome Tumoren mit Her2-Amplifikation mit 44 polysomen (Cen17 \geq 3) und 36 nicht-polysomen Tumoren (letztere beide jeweils ohne Her2-Amplifikation) bezüglich prognostischer Faktoren. Verglichen mit den nicht-polysomen Tumoren ohne Her2-Amplifikation wurde bei den polysomen Tumoren ohne Her2-Amplifikation ein höheres nukleäres und histologisches Grading, eine größere mitotische Aktivität, ein schlechterer NPI-Score sowie eine Östrogen-Rezeptor (ER)-Negativität gefunden. Somit zeigten polysome Tumoren ohne Her2-Amplifikation eine Tendenz zu Tumoren mit Her2-Amplifikation [49].

Gegensätzliches impliziert eine Studie (n = 226) von Vanden Bempt et al., die polysome (n = 62; Cen17 \geq 3) und nicht-polysome Brusttumoren (n = 67) (beide Gruppen jeweils ohne Her2-Amplifikation) mit 97 Her2-positiven Tumoren bezüglich klinisch-pathologischer Parameter verglichen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in histologischem Grad, Tumorgöße, NPI, nodalem Zustand oder Hormonrezeptorpositivität zwischen den jeweils Her2-negativen, polysomen und nicht-polysomen Tumoren festgestellt. In Übereinstimmung mit der Studie (n = 214) von Watters et al. [37] ging Polysomie ohne Her2-Amplifikation mit pathologisch-günstigeren Eigenschaften einher als die Her2-positiven Tumoren und zeigte im Gegensatz zu Krishnamurti et al. [49] keine ähnliche Prognose wie Her2-amplifizierte Tumoren. Dennoch wiesen die polysomen Tumoren gegenüber den normalen, nicht-polysomen und nicht-amplifizierten einen Trend zu verringertem Überleben auf. Trotzdem

hatten Patientinnen mit polysomen Tumoren ohne Her2-Amplifikation im Vergleich zu den Erkrankten mit Her2-amplifizierten Tumoren ein längeres DFS [44].

Trotz der Diskrepanzen stellen diese Studienergebnisse Indizien für die Assoziation einer vergrößerten Cen17-Anzahl (Polysomie 17) mit ungünstigen klinisch-pathologischen Variablen dar, obgleich in einem geringeren Umfang als eine Her2-Amplifikation [26].

Es fällt auf, dass in keiner der oben genannten Untersuchungen hinterfragt wird, ob die erhöhte Cen17-Kopienzahl tatsächlich eine Polysomie 17 widerspiegelt oder eine alleinige (Ko-)Amplifikation des Zentromers Cen17 darstellt. Da die Unterscheidung zwischen "echter" Polysomie 17 und solitärer Cen17-Amplifikation ausbleibt, kann nicht sichergestellt werden, ob letztlich der klinisch-pathologische Kontext von Polysomie 17 oder einer Cen17-(Ko-)Amplifikation diskutiert wurde.

Um die Bedeutung einer "echten" Polysomie 17 für die klinische Prognose zu erfassen, sind Studien zur Abgrenzung erforderlich, beispielsweise mithilfe alternativer Marker, und eine gesonderte prospektive Dokumentation der jeweiligen Krankheitsverläufe von Polysomie 17 und Cen17-(Ko-)Amplifikation. Ein eindeutiger diagnostischer Test, mit dem eine "echte" Polysomie identifiziert und von einer Amplifikation der Zentromer-Region unterschieden werden könnte, wäre essentiell.

1.5.2 Therapie

Die potentielle Assoziation zwischen erhöhter Cen17-Anzahl und Her2-Expression wirft die Frage auf, inwieweit Patienten mit polysomen Tumoren von einer Her2-gerichteten Therapie profitieren.

Diese Problemstellung ist besonders für Patienten mit einem Polysomie-assoziierten IHC 3+ Score bei gleichzeitig negativer ISH-Ratio interessant, welchen unter dem Vorwand eines möglicherweise "falsch-positiven" IHC-Befundes und einem diagnostisch negativen FISH-Befund eine Trastuzumab-Therapie verwehrt wird [26]. Für die Analyse des Zusammenhangs zwischen Polysomie 17 und dem Ansprechen auf eine Her2-gerichtete Therapie betrachteten Hofmann et al. in einer retrospektiven Analyse 105 Her2-amplifizierte Tumoren: Polysomie 17 ($Cen17 \geq 3,0$) wurde in 27% (26/105) beobachtet, wovon sechs Patienten auf Trastuzumab ansprachen. Die sechs Tumoren wiesen einen IHC 3+ Score auf, wobei in fünf Fällen eine Membranfärbung von $> 80\%$ und in einem Fall von 50% beobachtet wurde. Vier von sechs polysomen Tumoren zeigten eine Her2/Cen17 Ratio $> 2,0$, während die verbleibenden zwei eine negative Ratio ($< 2,0$) bei gleichzeitig Polysomie-assoziiertes, erhöhter Her2-

Genkopienzahl aufwiesen. Diese beiden zeigten eine PR ("partial response") auf Trastuzumab und sind nachfolgend hervorgehoben:

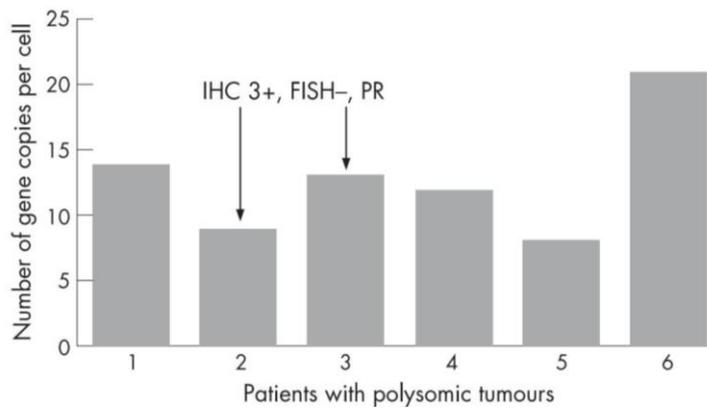


Abbildung 5: Her2-Genkopien in 6 polysomen Tumoren mit Trastuzumab-Antwort [45]

Zusätzlich nahmen Hofmann et al. eine weitere Subdifferenzierung polysomer Fälle vor. So wurden Fälle mit niedriger (3,0 - 4,0 Cen17-Signale), mittlerer (4,0 - 5,0 Cen17-Signale) und hoher Cen17-Anzahl (Cen17-Signale > 5,0) unterschieden.

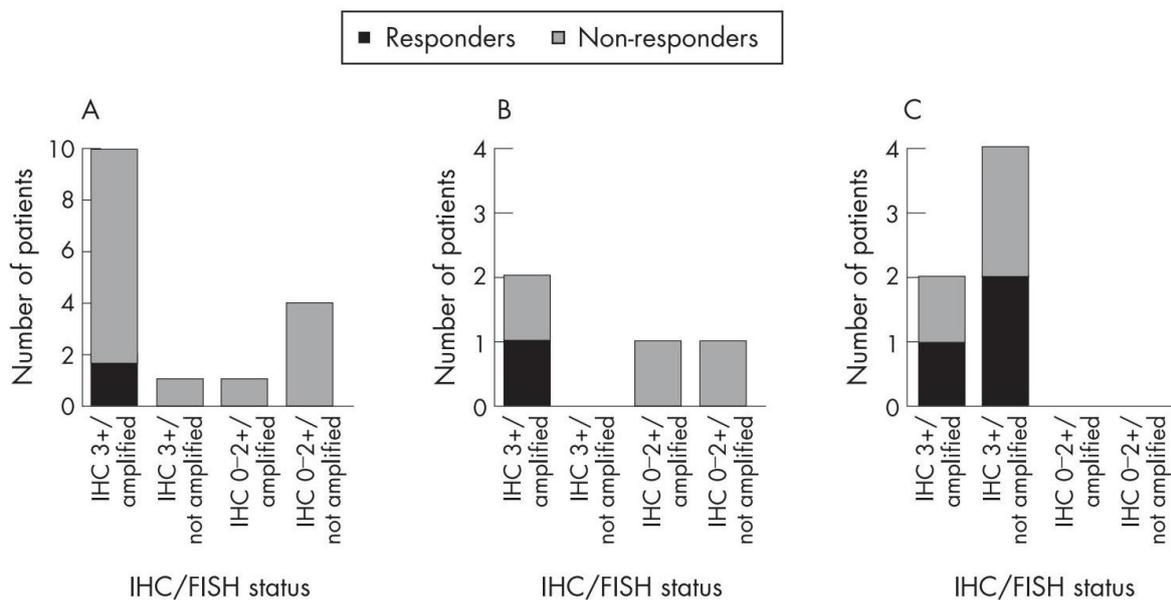


Abbildung 6: Korrelation zwischen Cen17-Anzahl, IHC und Antwortrate [30]

- A) niedriggradige Polysomie (3,0 - 4,0)
- B) mittelgradige Polysomie (4,0 - 5,0)
- C) hochgradige Polysomie (> 5,0)

Laut Hofmann et al. sprechen Patienten mit einer Polysomie-assoziierten Her2-Überexpression ohne Her2-Amplifikation auf Trastuzumab an, die Effektivität einer Her2-

gerichteten Therapie wird also nicht von der Cen17-Kopienzahl beeinflusst. Zudem sollten IHC 3+ Tumoren als Her2-positiv - unabhängig vom ISH-Resultat - angesehen werden. Hofmann et al. schlagen außerdem ein strikt standardisiertes Reflex-Testen mit IHC für polysome Fälle vor, da Polysomie 17 häufigster Grund für eine Trastuzumab-Antwort in ISH-negativen Fällen ist [30]. Auch in anderer Fachliteratur scheint sich als evidenzbasierter Konsens heraus zu kristallisieren, dass Fälle mit einem 3+ IHC-Score und einer durch Polysomie 17 erniedrigten Her2/Cen17 Ratio ($< 2,0$) auf eine anti-Her2 Therapie ansprechen [71].

Neben ISH-negativen Tumoren konnte auch bei ISH-positiven (Ratio $\geq 2,0$) Tumoren mit erhöhten Cen17-Zahlen ein Trastuzumab-Erfolg verzeichnet werden: Die retrospektive Analyse der HERA-Studie (Herceptin adjuvant) von Dowsett et al. unterstreicht, dass die Effizienz von adjuvanter Trastuzumab-Therapie bei Patienten mit Her2-positiven Mammakarzinomen von der erhöhten Cen17-Zahl nicht beeinflusst wird: 43% (883/2030) wiesen neben einer ISH-Ratio $\geq 2,0$ eine Polysomie auf (Cen17 $\geq 3,0$). Sowohl in den 883 Her2-positiven, polysomen Fällen hielt Trastuzumab das DFS aufrecht als auch in den Her2-positiven ohne erhöhte Cen17-Zahl ($n = 1147$) [76]. Auch bei Perez et al. profitierten Patienten mit Her2-amplifizierten Tumoren (ISH-Ratio $\geq 2,0$ oder IHC 3+ oder beides) - unabhängig vom Polysomie 17-Status und der Her2/Cen17 Ratio - signifikant von einer Trastuzumab-Therapie [77]. Ebenso detektierten Gaiser et al. unter 105 Her2-positiven (IHC 3+ oder Ratio $\geq 2,0$) Patienten 27% (26/105) polysome Tumoren, von denen sechs auf eine Trastuzumab-Therapie ansprachen [71].

Selbst Patienten mit polysomen Tumoren, die weder IHC-positiv noch ISH-positiv sind, profitieren laut Kaufman et al. von einer Trastuzumab-Therapie [78]: Von 133 Her2-negativen Mammakarzinomen (Her2/Cen17 $< 2,0$, keine IHC 3+) aus der CALGB 150002 Studie [79], in der sie mit Paclitaxel und zusätzlich mit oder ohne Trastuzumab behandelt wurden, zeigten 24,1% (31/133) eine Polysomie 17 (Cen17 $\geq 2,2$). Im Gegensatz zur nicht-polysomen Gruppe zeigte die Subgruppe der polysomen Tumoren einen signifikanten Profit von Paclitaxel in Verbindung mit Trastuzumab versus ohne Trastuzumab: 63% (12/19) versus 25% (3/12). Trastuzumab zeigt also selbst bei Tumoren mit einer erhöhten Cen17-Kopienzahl und gleichzeitig nicht erhöhter Her2/Cen17 Ratio und einem IHC-Score $< 3+$ Effizienz.

Downey et al. hingegen fanden keinen signifikanten Erfolg von first-line Lapatinib plus Paclitaxel versus ausschließlich Paclitaxel bei Patienten mit Her2-negativen, polysomen

Brusttumoren (n = 44). Im Gegensatz zu Kaufman et al. stellten sie kein besseres Chemotherapie-Outcome bei polysomen Tumoren fest [80].

Bedauerlicherweise unterscheidet keine der angeführten Studien, die den Zusammenhang von erhöhter Cen17-Zahl und Her2-gerichteter Therapie untersuchten, zwischen "echter" Polysomie 17 und einer Cen17-Amplifikation ohne Vermehrung des Chromosoms. Zur Vorhersage des Therapieerfolgs tatsächlich polysomer Tumoren ist die vorgängige Abgrenzung von einer Cen17-Amplifikation unumgänglich. Womöglich ist die fehlende Unterscheidung ein Grund für die Bandbreite differierender Meinungen bezüglich des Therapieerfolgs polysomer Tumoren, da "pseudopolysome" Tumoren nicht ausgeschlossen werden. Unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunkts könnten Studien mehr Sicherheit bei therapeutischen Entscheidungen für polysome Tumoren geben. Die diagnostische Differenzierung zwischen einer "echten" und einer scheinbaren Polysomie 17 (bzw. die Klassifizierung von Tumoren mit erhöhter Cen17-Anzahl), z. B. mithilfe alternativer Hybridisierungsmarker, könnte zu einer besseren Stratifizierung von Mammakarzinompatientinnen beitragen.

Neben Her2-gerichteten Therapien scheint eine Polysomie 17 auch Einfluss auf das Ansprechen auf weitere Therapien des Mammakarzinoms zu haben [26]. In einer Studie von Bartlett et al. (n = 1941) war der entscheidende Prädiktor einer Sensitivität für Anthrazyklin-basierte Chemotherapie eine Vermehrung von Cen17 [81]. Andere Autoren hingegen machen erhöhte Anzahlen des Gens für Topoisomerase (TOP2A) verantwortlich für die Anthrazyklin-Sensitivität, was sowohl durch eine Genamplifikation als auch durch Polysomie 17 bewerkstelligt werden kann [82]. TOP2A tritt als Schlüsselprotein während der DNA-Transkription und -Replikation auf und spielt bei der Lösung topologischer Probleme wie DNA-Supercoiling eine Rolle [11]. Nach einer anderen Studie (n = 3846) von Bartlett et al. profitieren Patientinnen mit Tumoren, die eine Cen17-Duplikation oder TOP2A-Amplifikation aufweisen, von einer adjuvanten Anthrazyklin-Chemotherapie, unabhängig davon, ob eine Her2-Amplifikation vorliegt oder nicht [83]. Offen bleibt dabei, ob die erhöhte Cen17-Anzahl eine Polysomie 17 oder eher eine chromosomale Instabilität, beispielsweise in Form einer Cen17-(Ko-)Amplifikation, widerspiegelt [84]. Die erhöhte Cen17-Zahl könnte zu einer Disregulation der Spindelaufteilung führen, welche - in vitro mit einer Anthrazyklin-Sensitivität verlinkt - diesen Mechanismus erklären würde [83]. Zudem liegt TOP2A sehr nah am Zentromer 17, was die Involvierung in perizentrische Amplifikationen möglich macht. Bezüglich der Bedeutung von TOP2A, Her2 und Cen17 als prädiktive Marker für eine

Anthrazyklin-Antwort existieren in der wissenschaftlichen Literatur bislang zahlreiche Inkonsistenzen [81].

Auch die Therapie-Empfehlungen für zweifelhafte Fälle, welche häufig polysom sind [22],[26],[41],[42],[85] und in der onkologischen Praxis aufgrund mangelnder Leitlinien ein therapeutisches Dilemma darstellen, werden an dieser Stelle angeführt: Bei Dowsett et al. hatten Patienten mit niedrig Her2-amplifizierten Tumoren (Her2-Signale: 4,0 - 9,0) im Vergleich zu Patienten mit hoch amplifizierten Tumoren (> 9,0) ein vergleichbares Outcome. Diese Beobachtung impliziert, dass Patienten mit mittlerer Her2-Genkopienzahl (4,0 - 6,0) ebenfalls von einer Her2-gerichteten Therapie profitieren - unabhängig von der Ratio. Diesen Patienten sollte eine Her2-gerichtete Therapie nicht vorenthalten werden [76]. Auch Resultate des N9831-Versuchs schlagen eine anti-Her2 Therapie für alle Patienten mit einer Her2-Kopienzahl $\geq 4,0$ vor [77]. Übereinstimmend wird davon ausgegangen, dass Neoplasmen mit vergrößerter Her2-Kopienzahl - selbst in der zweifelhaften Spanne 4,0-6,0 - auf eine anti-Her2 Behandlung ansprechen, unabhängig von der Cen17-Zahl und der Her2/Cen17 Ratio [85],[64].

Andere Autoren sehen diesen therapeutischen Vorschlag kritisch: Laut Varshney et al. ist die Mehrheit der IHC 2+ Fälle einer artefaktisch starken Färbung und weder einer Genamplifikation noch einer Polysomie 17 zuzuschreiben. Patientinnen, die wahrscheinlich nicht von einer anti-Her2 Therapie profitieren, sollten nicht mit einer potentiell kardiotoxischen Trastuzumab-Therapie belastet werden [39].

1.6 Zielsetzung

Die Bestimmung des Her2-Status durch akkurate diagnostische Mittel ist entscheidend für den berechtigten Zugang zu einer Her2-gerichteten Therapie. Angestrebt wird, möglichst alle Patienten mit einer Her2-Überexpression einer anti-Her2 Therapie zuzuführen und dabei gleichzeitig sicher als Her2-negativ diagnostizierte Patienten nicht mit einer unwirksamen Behandlung zu belasten.

Bisher wird in der ISH-Routinediagnostik (in-situ-Hybridisierung) zur Messung des Her2-Status in der Regel die Zwei-Marker Sonde von PathVysion verwendet, die zusätzlich zur Her2-kodierenden Region die Zentromer 17-Region (Cen17) hybridisiert. Das Hinzuziehen des zusätzlichen Markers Cen17, der als Surrogat für die Häufigkeit von Chromosom 17 angesehen wird [55], soll Aufschluss über eine eventuelle Vervielfachung des Chromosoms 17 (Polysomie 17) geben. Damit soll sicher ausgeschlossen werden, dass eine vermehrte Her2-Kopienzahl durch eine Chromosomenvermehrung und nicht durch eine echte Genamplifikation bedingt ist. So wird aktuell davon ausgegangen, dass nur Patientinnen mit einer Her2-Rezeptor-Überexpression, die auf eine eindeutige Her2-Genamplifikation zurückzuführen ist, potentiell von einer anti-Her2 Therapie profitieren.

Die Zuverlässigkeit von Cen17 als Marker für die Häufigkeit von Chromosom 17 und als Indikator einer Polysomie 17 wird jedoch zunehmend in Frage gestellt.

Zahlreiche Studienergebnisse, die mittels Mehrmarkersonden FISH, CGH oder MLPA ("multiplex ligation-dependent probe amplification") erhoben wurden, belegen, dass erhöhte Zahlen von Cen17 am häufigsten durch fokale Amplifikationen des Zentromers 17 selbst und nicht durch Polysomie 17 bedingt sind [86],[8],[55],[57],[58],[81]. Dadurch, dass die Zentromer 17-Region vielfach amplifiziert vorliegt, während Chromosom 17 als Ganzes keine numerischen Aberrationen zeigt, wird Cen17 seiner Rolle als "pars pro toto" möglicherweise nicht gerecht [71]. Vermehrte Signale von Cen17 im Rahmen einer alleinigen Cen17-Amplifikation führen zu einer erniedrigten Her2/Cen17 Ratio ($< 2,0$), was eine mögliche Her2-Amplifikation kaschieren und bedürftigen Patienten die Therapie verwehren kann.

Dieses diagnostische Dilemma wird anhand von vier theoretischen Fallbeispielen in der folgenden Abbildung veranschaulicht:

<i>HER2</i> gene copy number	cen17 putatively co-amplified	Putative <i>HER2</i> /cen17 ratio	Assumed true chromosome 17 number (due to cen17 co-amplification)	Assumed true <i>HER2</i> /cen17 ratio
3.0	3.0.	1.0 (i.e. <i>HER2</i> -neg.)	2.0	1.5 (i.e. <i>HER2</i> -neg.)
4.0	4.0	1.0 (i.e. <i>HER2</i>-neg.)	2.0	2.0 (i.e. <i>HER2</i>-pos.)
5.0	5.0	1.0 (i.e. <i>HER2</i>-neg.)	2.0	2.5 (i.e. <i>HER2</i>-pos.)
5.9	5.9	1.0 (i.e. <i>HER2</i>-neg.)	2.0	2.95 (i.e. <i>HER2</i>-pos.)

Tabelle 3: Abhängigkeit des diagnostischen Her2-Status von einer Cen17-Koamplifikation [87]

Säule 3 ("Putative Her2/Cen17 Ratio") zeigt die Interpretation von vier theoretischen Fällen in der Annahme, dass es sich um eine Polysomie 17 und somit eine adäquate Vermehrung von Cen17 handelt. Dabei werden alle vier Fälle als Her2-negativ (Ratio = 1,0) eingestuft.

Säule 5 ("Assumed true Her2/Cen17 Ratio") hingegen zeigt den Her2-Status in der Annahme, dass Cen17 koamplifiziert zu Her2 vorliegt. Statt des koamplifizierten Cen17-Signals wird in die Berechnung ein nicht-amplifiziertes Cen17-Signal (Cen17 = 2,0) einbezogen. Die Konsequenz daraus ist, dass drei Fälle (fett gedruckt) als Her2-positiv eingestuft werden, die zuvor durch die Cen17-Koamplifikation als falsch-negativ identifiziert wurden [87].

Die Unterscheidung zwischen "echter" Polysomie 17 und Cen17-Amplifikation vorzunehmen, ist ein wesentlicher Schritt, um eine Her2-Amplifikation sicher zu diagnostizieren. Außerdem führen vermeintlich als polysom diagnostizierte Tumoren in der onkologischen Praxis zu zusätzlicher Verunsicherung, da die Prognose und Therapie polysomer Tumoren ohnehin umstritten ist. Um diese Unklarheiten bezüglich Tumoren mit erhöhter Cen17-Kopienzahl zu beseitigen, ist eine akkurate Diagnostik mit nicht-amplifizierten und für die Häufigkeit von Chromosom 17 zuverlässigen Markern entscheidend.

Somit war ein Ziel der vorliegenden Dissertation, zytogenetische Marker für die Detektion einer "echten" Polysomie 17 zu verifizieren, die die Häufigkeit von Chromosom 17 möglichst zuverlässig in Her2-amplifizierten Tumoren widerspiegeln und damit eine Alternative zum bisherigen Standardmarker Cen17 darstellen. Dafür wurden mithilfe der Tumordatenbank des "Broad Institute of MIT and Harvard" [88] gezielt Regionen auf Chromosom 17 ausgewählt, die vergleichsweise selten amplifiziert vorliegen. Es wurden drei Genloci identifiziert, die alle auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) liegen, da auf 17p - im Vergleich zum langen Arm 17q - in der Gesamtschau der Tumordatenbank deutlich weniger Alterationen gefunden wurden:

- RAI1 / SMS ("retinoic acid induced 1" oder "Smith Magenis syndrom", 17p11.2)
- TP53 (Tumorsuppressorprotein 53, 17p13.1)
- D17S122 (17p122)

Hinsichtlich der Frage, ob diese 17p-Hybridisierungsmarker bei der Differenzierung zwischen "echter" und "falscher" Polysomie 17 (Cen17-Amplifikation) hilfreich sind, wurden eine dual-Marker FISH-Sonde (D17S122/Her2) und zwei triple-Marker FISH-Sonden (TP53/Cen17/Her2; RAI1/Cen17/Her2) auf folgende Kollektive angewendet:

- 82 potentiell polysome Tumoren mit einem Cen17-Zugewinn ($\text{Cen17} > 2,24$)
- 52 Tumoren mit einer normal-diploiden Cen17-Anzahl $< 2,24$
- 78 Tumoren mit einer Her2-Amplifikation ($\text{Her2/Cen17} \geq 2,0$)
- 20 Gewebeproben aus Brustreduktionen gesunder Frauen als benigner Standard

Eventuelle Polyploidien des gesamten Genoms wurden durch das zusätzliche Hinzuziehen von Chromosom 13-, Chromosom 21- und Chromosom 18-spezifischen Markern untersucht. Zudem wurden ausgewählte Tumorproben einer aCGH ("array-based comparative genomic hybridization") unterzogen, um gezielt chromosomale und genomische Instabilitäten einer fokalen Cen17-(Ko-)Amplifikation bzw. Her2-Amplifikation beurteilen zu können.

Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Subgruppe der zweifelhaften Fälle ("equivocals") gelegt. Die potentielle Reduzierung zweifelhafter Fälle würde eine wesentliche Erleichterung für die klinisch-onkologische Praxis bedeuten, da die Klassifizierung als "zweifelhaft" per se keine Grundlage für eine Therapieentscheidung sein kann bzw. aufgrund fehlender Evidenz mit großer Unsicherheit bezüglich des therapeutischen Vorgehens verbunden ist. Unter den aktualisierten Richtlinien (2013) der ASCO/CAP ("American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists") ist eine beträchtliche Vermehrung der zweifelhaften Fälle ("the new equivocals") festzustellen [89], sodass diagnostische Maßnahmen zur Reduzierung dieser therapeutisch-strittigen Fälle klinisch-pathologisch sehr relevant sind.

Dazu kommt erschwerend, dass immer mehr Tumoren mit erhöhter Cen17-Zahl unter dem aktuellen Leitfaden als zweifelhaft eingestuft werden [22],[26],[42],[85]. Dies bedeutet eine weitere Verunsicherung für die ohnehin therapeutisch-umstrittenen zweifelhaften Fälle.

Somit stellte die Reduktion der zweifelhaften Fälle ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation dar. Es wurde evaluiert, ob sich die Subfraktion der zweifelhaften Fälle durch ein Reflex-Testen mithilfe der alternativen 17p-Hybridisierungsmarker und eines rechnerisch entwickelten "Marker-Kombinations-Score" in klinisch Her2-positive und Her2-negative Fälle aufteilen lässt.

2 Untersuchung

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Probenauswahl und Gewebskollektive

Alle inkludierten FFPE-Proben ("formalin-fixed paraffin-embedded") enthalten Gewebe aus invasiven Mammakarzinomen vom Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg.

Dem Archiv wurden Tumorgewebe entnommen, die bereits alle einer IHC (HercepTest, Dako, Glostrup, Denmark) und im Falle eines IHC 2+ Score einer FISH mit der PathVysion-Sonde Her2/Cen17 (Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA) unterzogen worden waren. Die IHC 2+ Fälle, bei denen eine FISH durchgeführt wurde, bilden die Grundlage für zwei Kollektive der vorliegenden Studie:



Abbildung 7: 2 aus 4 Patientenkollektiven

Anhand des Cen17-Signals wurde zwischen dem "nicht-polysomen" ($\text{Cen17/Zellkern} \leq 2,24$) und "potentiell polysomen" ($\text{Cen17/Zellkern} > 2,24$) Tumorkollektiv unterschieden. Das nicht-polysome Tumorkollektiv beinhaltet ausschließlich Her2-negative Fälle ($\text{Her2/Cen17 Ratio} < 2,0$) und trägt deshalb zusätzlich die Bezeichnung "nicht-Her2-amplifiziert".

Das Attribut "potentiell" macht die Unsicherheit bezüglich einer "echten" Polysomie 17 deutlich, so steht hier "polysom" primär für Tumoren mit einer erhöhten Cen17-Kopienzahl im Vergleich zum benignen Gewebe.

Zudem wurden aus dem Archiv Tumorgewebe hinzugezogen, die von der PathVysion-Sonde als Her2-positiv eingestuft worden waren ($\text{Her2/Cen17 Ratio} \geq 2,0$). Diese Her2-positiven Fälle bilden das "Her2-positive" Tumorkollektiv.

Als benigner Standard dienen Gewebe aus Brustverkleinerungen gesunder Frauen:



Abbildung 8: 2 aus 4 Patientenkollektiven

Alle Fälle des Her2-positiven Tumorkollektivs weisen eine IHC 3+ auf.

Das Her2-positiv Tumorkollektiv beinhaltet zudem zwei zweifelhafte Fälle (Ratio < 2,0).

Die Her2/Cen17 FISH-Daten und zugehörigen IHC-Scores aller Proben innerhalb der einzelnen Kollektive finden sich im Anhang (siehe Abschnitt 3.3).

2.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die vier Kollektive wurden einer FISH mit folgenden Sonden von ZytoVision (Bremerhaven, Deutschland) unterzogen:

Her2/D17S122 RAI1/Her2/Cen17 TP53/Cen17/Her2.

FISH wurde auf 4 µm dicken FFPE-Gewebeschnitten aller vier Kollektive durchgeführt.

Für alle Gewebe der vier Kollektive wurde ein repräsentativer Bereich aus dem Donor-Block ausgewählt, der mithilfe eines Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Gewebeschnittes identifiziert wurde. Aus dem Block wurden Zylinderstücke mit einem Durchmesser von 1,5 mm ausgestanzt und in einem Empfänger-Paraffinblock deponiert. Anschließend wurden die TMAs ("tissue microarrays") auf Objektträger (SuperFrost™Plus; Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) übertragen. Diese wurden für 35 min in einem Inkubator bei 72°C und jeweils 10 min zweimal hintereinander in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 80%, 70%) jeweils 2 min rehydriert und nachfolgend mit destilliertem Wasser gespült. Darauffolgend wurden die TMAs in 0,01 N Natriumcitrat platziert und für 30 min in ein 98°C heißes Wasserbad gegeben. Nachdem Zellstrukturen in 0,1% Fertigpepsin (ZytoVision) für 4 min bei 37°C verdaut wurden, wurde der Verdau durch ein kurzes Waschen mit zweimal SSC ("Saline Sodium Citrate") gestoppt und die Objektträger wurden in eine absteigende Ethanolreihe (100%, 80%, 70%) jeweils 1 min zur Dehydrierung gegeben und anschließend an der Luft getrocknet. Auf das inzwischen

durch die Denaturierung dunkel gefärbte Gewebe wurden jeweils 10 µl der Hybridisierungssonden aufgetragen. Darauf wurde ein Deckglas, das mit Fixogumm luftdicht abgeschlossen wurde, gegeben. Für die Denaturierung der DNA wurden die Objektträger 5 min auf einer 73°C warmen Heizplatte platziert und über Nacht in einer Hybridisierungskammer bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Deckglases wurden die Objektträger sukzessiv für jeweils 10 min in folgende 50°C heiße Wasserbäder getaucht: viermal SSC plus Igepal (Serva, Heidelberg, Germany), zweimal SSC und einmal SSC. Anschließend wurden die Objektträger mit Millipore Wasser gespült und luftgetrocknet. Die Nuclei wurden mit schwundmindernder DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol; Vectashield Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gegengefärbt und mit einem Epifluoreszenzmikroskop analysiert [90],[91]. Hämatoxylin/Eosin-gefärbte TMAs wurden als Referenzhistologie verwendet.

2.1.3 Design und Generierung der Hybridisierungssonden

Um Regionen auf Chromosom 17 zu identifizieren, die nicht häufig alteriert (koamplifiziert oder deletiert) in Her2-amplifizierten Tumoren vorliegen, wurde die Tumordatenbank des "Broad Institute of MIT and Harvard" (siehe Abschnitt 3.4) [88] hinzugezogen. Eine fokussierte Evaluation ergab, dass sowohl der kurze Arm 17p als auch der lange Arm 17q von Chromosom 17 häufig abnorme Kopienzahlen zeigen, die Alterationen aber häufiger auf 17q als auf 17p vorkamen. Aus diesem Grund wurden drei rar amplifizierte Regionen auf dem kurzen Arm 17p identifiziert: RAI1 (17p11.2), D17S122 (17p12) und TP53 (17p13.1). Entsprechend wurden drei FISH-Proben hergestellt (GRCh37/hg19 genome assembly) - wie an anderer Stelle beschrieben [92]:

- (i) chr17: 17,417,527-17,829,492
- (ii) chr17: 14,954,785-15,434,017
- (iii) chr17: 7,420,260-7,739,519

Die Proben wurden kombiniert mit bereits etablierten Proben, die gegen Cen17 (die Zentromer-Region von Chromosom 17: 17p11.1-q11.1, D17Z1) und Her2 (17q12, chr17: 37,572,531-38,181,308) gerichtet sind. Neben der Zwei-Marker FISH-Sonde Her2/D17S122 wurden drei triple-kolorierte Hybridisierungssonden verwendet: TP53/Her2/Cen17, RAI/Her2/Cen17 und ZytoLight Spec13/Cen18/Spec21 (alle vier Sonden von ZytoVision) [93]. Alle Gewebeproben wurden mit den Sonden Her2/Cen17/RAI1, Her2/Cen17/TP53, Her2/D17S122 und Her2/Cen17 untersucht. Die Sonde Spec13/Cen18/Spec21 wurde auf alle Kollektive - außer das Her2-positive Tumorkollektiv - angewendet.

2.1.4 Mikroskopie, FISH-Signalzählung und Dokumentation

Die Objektträger wurden mit einem AxioImager Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet, das mit einem spezifischen Filterset für DAPI-Fluoreszenz (Absorption 360 ± 20 nm, Emission 460 ± 25 nm), SpectrumGrün-Fluoreszenz (Anregung 480 ± 15 nm, Emission 535 ± 20 nm), SpectrumOrange-Fluoreszenz (Anregung 538 ± 10 nm, Emission 575 ± 15 nm) und SpectrumRot-Fluoreszenz (Anregung 580 ± 20 nm, Emission 630 ± 60 nm; alle Filter von AHF Tübingen, Deutschland) ausgestattet ist.

Von zwei unabhängigen Beobachtern wurden pro Gewebe in mindestens 25 Zellkernen Hybridisierungssignale gezählt, wobei der durchschnittliche Zählwert der einzelnen Marker für den Tumorschnitt gebildet wurde. Wenn notwendig, wurde mittels Hellfeldmikroskopie die Präsenz von entweder malignem oder benignem Brustgewebe im visuellen Feld verifiziert. Für jedes Gewebe wurden die Ratios aus Her2-Signalen und den anderen Markern (Cen17, RAI1, TP53, D17S122) gebildet und eine Bestimmung des Her2-Status gemäß den ASCO/CAP Leitlinien vorgenommen [93]. Außerdem wurde anhand der einzelnen Markersignale zwischen dem Vorliegen einer Polysomie 17 und Cen17-Koamplifikation unterschieden. Mithilfe der Triple-Sonden RAI1/Her2/Cen17 und TP53/Cen17/Her2 wurde ein Kombinations-Score entwickelt, der die Gegenüberstellung des Her2-Signals mit dem Mittelwert aus Cen17 und einem alternativen Marker (TP53 oder RAI1) - ergo eine unmittelbare Gegenüberstellung der Häufigkeiten des langen und kurzen Arms von Chromosom 17 - ermöglichte [87].

2.1.5 Evaluation echter Polysomie 17

Innerhalb des potentiell polysomen Kollektivs wurde zusätzlich eine detaillierte Markeranalyse durchgeführt. Eine "echte" Polysomie 17 wurde im Fall eines homogenen Zugewinns aller fünf Hybridisierungsmarker angenommen. Ein homogener Zugewinn aller Marker lag vor, wenn keiner der Marker um mehr als 0,5 Signale von der Signanzahl eines anderen Markers der jeweiligen Tumorzelle abwich. Entsprechend lag ein nicht-homogener Zugewinn vor, wenn sich die einzelnen Markersignale fallintern um mehr als 0,5 unterschieden. Diese Fälle wurden als nicht "echt" polysom gewertet oder als Polysomie mit zusätzlichen Markeralterationen [87].

2.1.6 DNA-Extraktion und aCGH

11 ausgewählte Proben wurden zusätzlich einer aCGH-Analyse unterzogen:

Dafür wurden FFPE-Gewebeproben mit der höchsten Ratio von Tumor-/Nicht-Tumorbereichen ausgewählt und Gewebe mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Tiefe von 3 mm aus Paraffinblöcken ausgestanzt. Anschließend wurde die DNA mithilfe des "QIAamp DNA FFPE Tissue Kit" aus den einzelnen Kernen der Proben extrahiert. Paraffin wurde in Xylene aufgelöst und entfernt. Nachfolgend wurden die Gewebeproben unter Denaturierungsbedingungen lysiert (kurze Proteinkinase K Digestion) und bei 90°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde die DNA mit 50 µl Wasser aus den Säulen eluiert. Die DNA-Ausbeute wurde mit einem "NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer" (ThermoFisher Scientific, Wilmington, NC, USA) quantifiziert. Zusätzlich wurde 0,1 µg-0,5 µg von jeder Probe auf ein 1,5%-haltiges Agarosegel gegeben, um die durchschnittliche Größenverteilung der extrahierten DNA zu schätzen. Ausschließlich DNA-Proben mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von annähernd 500 Basenpaaren (bp) und einem Gewicht von über 1,0 µg wurden in die aCGH-Analysen inkludiert.

Die benötigte Referenz-DNA wurde aus peripheren Blutlymphozyten von gesunden, männlichen Spendern mit dem "Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit" isoliert und nachfolgend mithilfe des "Covaris S220x Sonicators" (Covaris, Woburn, MA, USA) und Standard-Protokollen der Hersteller ("DNeasy® Blood & Tissue Handbook" - Juli 2006, "quick guide for DNA shearing with S220/E220 Focused-ultrasonicator" - Oktober 2015) in eine durchschnittliche Größe von 500 bp fragmentiert, um die Größenverteilung der Fragmente in der Referenzprobe an die der Testproben anzugleichen. Anschließend wurden die beiden DNA-Proben (Referenz und Test) mit dem "Agilent SureTag DNA Labeling Kit" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durch Fluorochrom-markierte Nukleotiden gekennzeichnet und auf "SurePrint G3 Human CGH 4 × 180K" Microarray Objektträgern (Designcode: 022060) mit geringen Modifizierungen gemäß den Anweisungen des Herstellers hybridisiert ("Agilent Oligonucleotide Array-based CGH for Genomic DNA Analysis", Version 7.1, Dezember 2011). Die durch die Probenaufarbeitung bereits gegebene Größenverteilung der erhaltenen DNA-Proben erforderte keine weitere Fragmentierung, weshalb der Restriktionsenzym-basierte Verdau im ursprünglichen "Agilent SureTag DNA"-Kennzeichnungsprotokoll nicht durchgeführt wurde. Jeweils ein Mikrogramm der Referenz- und Testproben wurde als Ausgangsmaterial für jede Kennzeichnungsreaktion benutzt. Die DNA-Proben wurden mit Primern gemixt und bei 98°C für 3 min denaturiert. Anschließend

wurde die DNA während einer isothermen Reaktion durch eine Exo(-)Klenow-DNA-Polymerase mit Cy5-dCTP (Test) oder Cy3-dCTP (Referenz) gekennzeichnet. Diese Reaktion wurde bei 37°C für 60 min durchgeführt und bei 65°C für 10 min inaktiviert. Die gekennzeichneten DNA-Proben wurden mittels der "Amicon Ultra 0.5"-Reinigungssäulen (Grenzwert von 30kDa) gereinigt und nachfolgend mit dem "NanoDrop ND-1000"-Instrument quantifiziert. Danach wurden die gekennzeichneten Test- und Referenzproben gemixt und für 24 Stunden auf aCGH-Arrays hybridisiert. Nach Hybridisierung und Auswaschung wurden die Microarrays mit dem "Agilent G2505C"-Microarray-Scanner durchleuchtet.

Die resultierenden TIFF-Dateien wurden mit der "Agilent Feature Extraction Software Version 10,7" verarbeitet und schließlich mit der "Agilent Genomic Workbench Software Version 6,5 Lite" analysiert. Für die Datennormierung und die Detektion von CNAs wurden der ADM-2-Algorithmus mit einem Schwellenwert von 7,0 und folgenden Einstellungen verwendet: GC-Korrektur 40 kb, Zentralisierungsschwellenwert 6,0, Binnengröße (Zentralisierung) 10, minimale Probenanzahl in aberranter Region 25, minimale absolute durchschnittliche log Ratio für die Region 0,25.

2.1.7 aCGH-Rohdaten

Die aCGH-Rohdaten wurden auf "NCBI Gene Expression Omnibus" (NCBI GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) hochgeladen. Die "Accession Number" ist GSE86305, letztes Zugriffsdatum: Dezember 2016 [87].

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Referenzbereiche

Aus dem benignen Gewebe errechnen sich mithilfe der dreifachen Standardabweichung folgende Marker-Referenzbereiche:

Her2	Cen17	D17S122	RAI1	TP53	Spec1	Spec13	Cen18
1,76-2,24	1,76-2,24	1,64-2,12	1,76-2,24	1,64-2,36	1,68-2,16	1,56-2,28	1,24-2,52

Tabelle 4: Referenzbereiche für Markersignale pro Zellkern

2.2.2 Markerzugewinne und -verluste

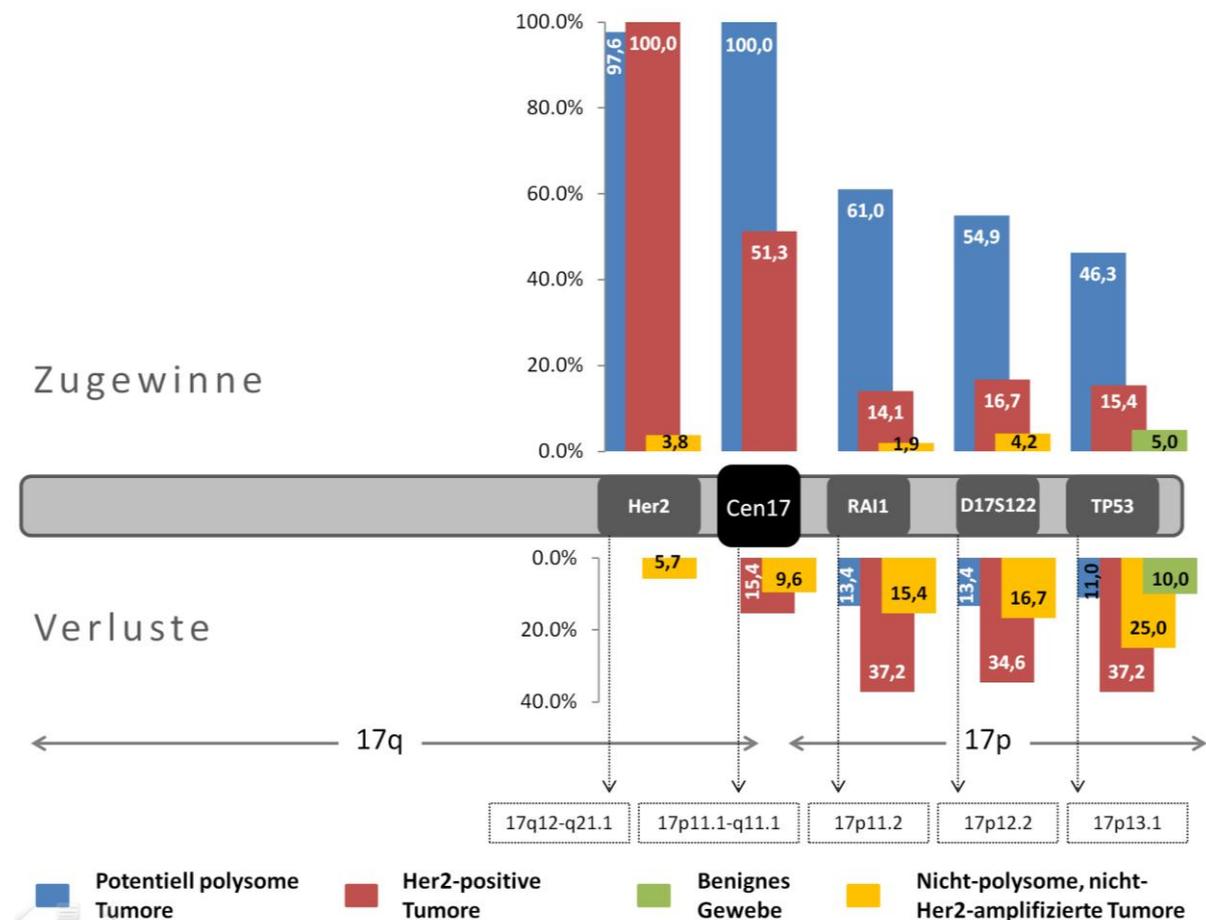


Abbildung 9: Markerzugewinne und -verluste aller Kollektive

Angeblich/potentiell polysomes Tumorkollektiv:

Zugewinne: Her2 in 97,6% (80/82), Cen17 in 100,0% (82/82), RAI1 in 61,0% (50/82), D17S122 in 54,9% (45/82) und TP53 in 46,3% (38/82)

Verluste: RAI1 in 13,4% (11/82), D17S122 in 13,4% (11/82) und TP53 in 11,0% (9/82)

Benignes Gewebekollektiv:

Zugewinne: TP53 in 5,0% (1/20)

Verluste: TP53 in 10,0% (2/20)

Her2-positives Tumorkollektiv:

Zugewinne: Her2 in 100,0% (78/78), Cen17 in 51,3% (40/78), D17S122 in 16,7% (13/78), TP53 in 15,4% (12/78) und RAI1 in 14,1% (11/78)

Verluste: Cen17 in 15,4% (12/78), D17S122 in 34,6% (27/78), RAI1 in 37,2% (29/78) und TP53 in 37,2% (29/78)

Nicht-polysomes, nicht-Her2-amplifiziertes Tumorkollektiv:

Zugewinne: Her2 in 3,8% (2/52), RAI1 in 1,9% (1/52) und D17S122 in 4,2% (2/48)

Verluste: Her2 in 5,7% (3/52), Cen17 in 9,6% (5/52), RAI1 in 15,4% (8/52), D17S122 in 16,7% (8/48) und TP53 in 25,0% (13/52)

In 17/20 benignen Kontrollproben sind keine Markerzugewinne oder -verluste zu beobachten. 2/20 Proben zeigen einen Verlust und 1/20 einen Zugewinn von TP53.

Auffällig im potentiell polysomen Tumorkollektiv ist eine deutliche Abnahme der Amplifikationshäufigkeit mit zunehmender Entfernung des Markers von der Zentromer-Region Cen17 (RAI: 61,0% > D17S122: 54,9% > TP53: 56,3%). So liegt TP53, der auf Chromosom 17 am weitesten außen gelegene Marker, am wenigsten amplifiziert vor. Während Her2 und Cen17 keine Verluste zeigen und fast in 100% der Fälle (Her2 in 97,6%, Cen17 in 100,0%) vermehrt vorliegen, rangieren die Verluste der 17p-Marker von 11,0% - 13,4%.

Im Her2-positiven Tumorkollektiv fällt auf, dass neben Her2 auch Cen17 deutlich amplifiziert vorliegt und mehr Zugewinne zeigt als alle 17p-Marker zusammen (51,3% versus 36,2%). RAI1, D17S122 und TP53 zeigen häufiger Verluste (34,6% - 37,2%) als einen Zugewinn (14,1% - 16,7%).

Im nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten Tumorkollektiv werden kaum Markerzugewinne beobachtet. Hinsichtlich der Markerverluste fällt eine kontinuierliche Zunahme nach außen hin in Richtung 17p auf: 5,7% (Her2) < 25,0% (TP53).

2.2.3 Markerzugewinne in Kombination

Eine "echte" Polysomie 17 impliziert aufgrund der Vermehrung des gesamten Chromosoms 17 eine erhöhte (und etwa gleiche) Anzahl aller Marker:

Im potentiell polysomen Tumorkollektiv liegen in 45,1% (37/82) und im Her2-positiven Tumorkollektiv in 3,8% (3/78) alle fünf Hybridisierungsmarker vermehrt vor, was möglicherweise auf eine Polysomie 17 hindeutet.

Weisen jedoch lediglich Her2 und Cen17 Zugewinne auf, während alle 17p-Marker keinen Zugewinn zeigen, legt das wahrscheinlich eine Cen17-Koamplifikation nahe:

Dies findet sich im potentiell polysomen Tumorkollektiv in 36,6% (30/82) und im Her2-positiven in 30,8% (24/78).

Zudem ist nicht nur eine Koamplifikation von Cen17 und Her2 zu beobachten, sondern auch eine alleinige Vermehrung des jeweiligen Markers: So findet sich im potentiell polysomen Tumorkollektiv ein alleiniger Zugewinn von Cen17 in 1,2% (1/82). Im Her2-positiven Tumorkollektiv findet sich wahrscheinlich in 41,0% (32/78) eine alleinige Her2-Amplifikation.

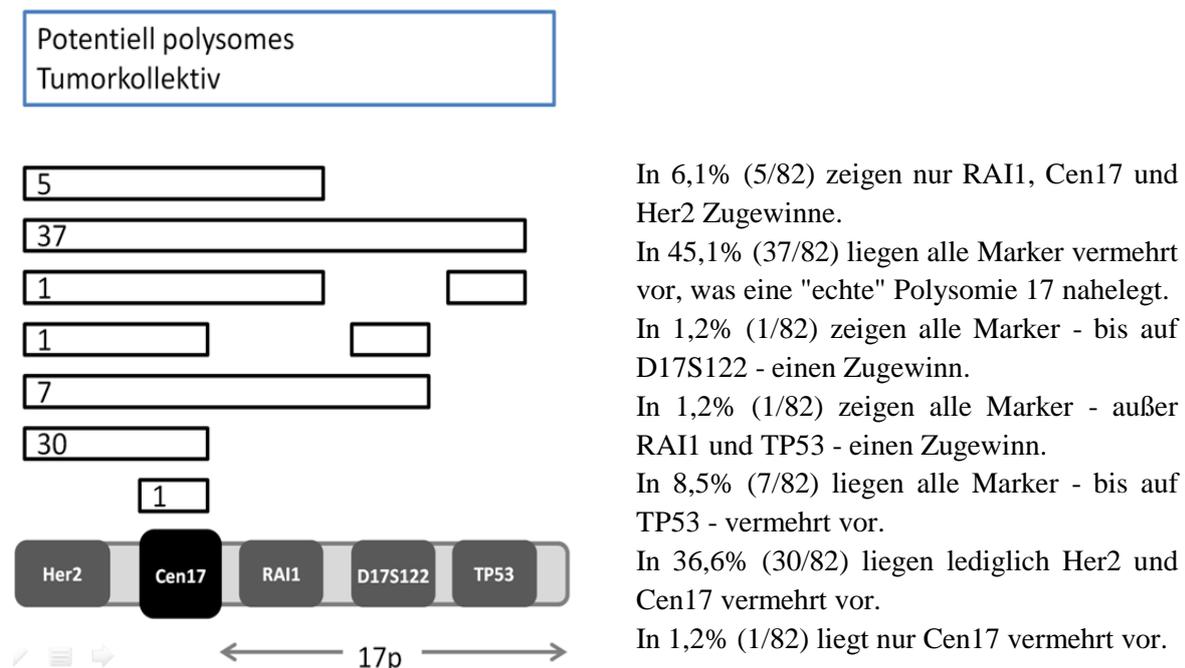
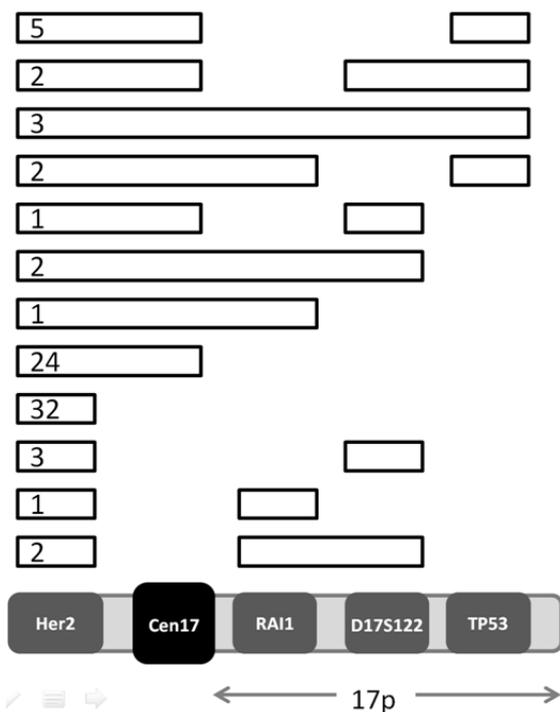


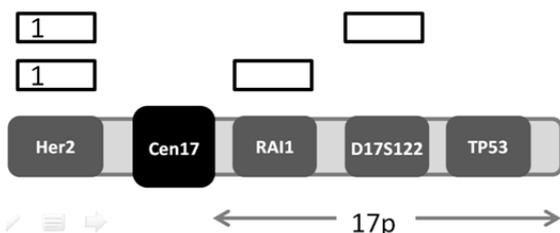
Abbildung 10: Kombinierte Markerzugewinne des potentiell polysomen Tumorkollektivs

Her2-positives Tumorkollektiv



In 6,4% (5/78) zeigen alle Marker - außer D17S122 und RAI1 - einen Zugewinn.
 In 2,6% (2/78) zeigen alle Marker - bis auf RAI1 - einen Zugewinn.
 In 3,8% (3/78) liegen alle Marker vermehrt vor.
 In 2,6% (2/78) zeigen alle Marker - bis auf D17S122 - einen Zugewinn.
 In 1,3% (1/78) zeigen alle Marker - außer RAI1 und TP53 - einen Zugewinn.
 In 2,6% (2/78) zeigen alle Marker - bis auf TP53 - einen Zugewinn.
 In 1,3% (1/78) zeigen alle Marker - außer D17S122 und TP53 - einen Zugewinn.
 In 30,8% (24/78) liegen nur Her2 und Cen17 vermehrt vor.
 In 41,0% (32/78) liegt nur Her2 vermehrt vor.
 In 3,8% (3/78) zeigen nur D17S122 und Her2 Zugewinne.
 In 1,3% (1/78) liegen lediglich Her2 und RAI1 vermehrt vor.
 In 2,6% (2/78) zeigen alle Marker - außer TP53 und Cen17 - einen Zugewinn.

Nicht-polysomes, nicht-Her2-amplifiziertes Tumorkollektiv



In 1,9% (1/52) zeigen D17S122 und Her2 Zugewinne.
 In 1,9% (1/52) liegen Her2 und RAI1 vermehrt vor.

Benignes Gewebekollektiv

Im benignen Gewebekollektiv sind keine Markerzugewinne - außer bei TP53 in 5% (1/20) - zu verzeichnen.

Abbildung 11: Kombinierte Markerzugewinne des nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten und des Her2-positiven Tumorkollektivs und des benignen Gewebekollektivs

2.2.4 Betrachtung "echt" polysomer Fälle

Gleichzeitige Zugewinne aller fünf Chromosom 17-Hybridisierungsmarker kennzeichnen wahrscheinlich eine Polysomie 17 und kommen in dieser Studie nur im potentiell polysomen und Her2-positiven Tumorkollektiv vor.

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

In 37/82 Fällen liegen alle fünf Marker (Her2, Cen17, RAI1, D17S122 und TP53) vermehrt vor, was wahrscheinlich eine "echte" Polysomie 17 nahelegt. Dennoch scheinen diese Fälle eine sehr heterogene Gruppe darzustellen: Lediglich in 11/37 Fällen liegt eine "homogene" Polysomie 17 vor, bei der alle fünf Marker nahezu identische Zugewinne zeigen. Auf das gesamte potentiell polysome Tumorkollektiv bezogen zeigen somit nur 13,4% (11/82) eine "echte, homogene" Polysomie 17.

Als *cutoff* wurde in dieser Arbeit die Signalzahl 0,5 festgelegt, d. h. "homogen" vermehrte Marker dürfen fallintern nicht mehr als 0,5 Signale voneinander abweichen.

Fallinterne Signalunterschiede > 0,5 sind dunkelgrau gekennzeichnet.

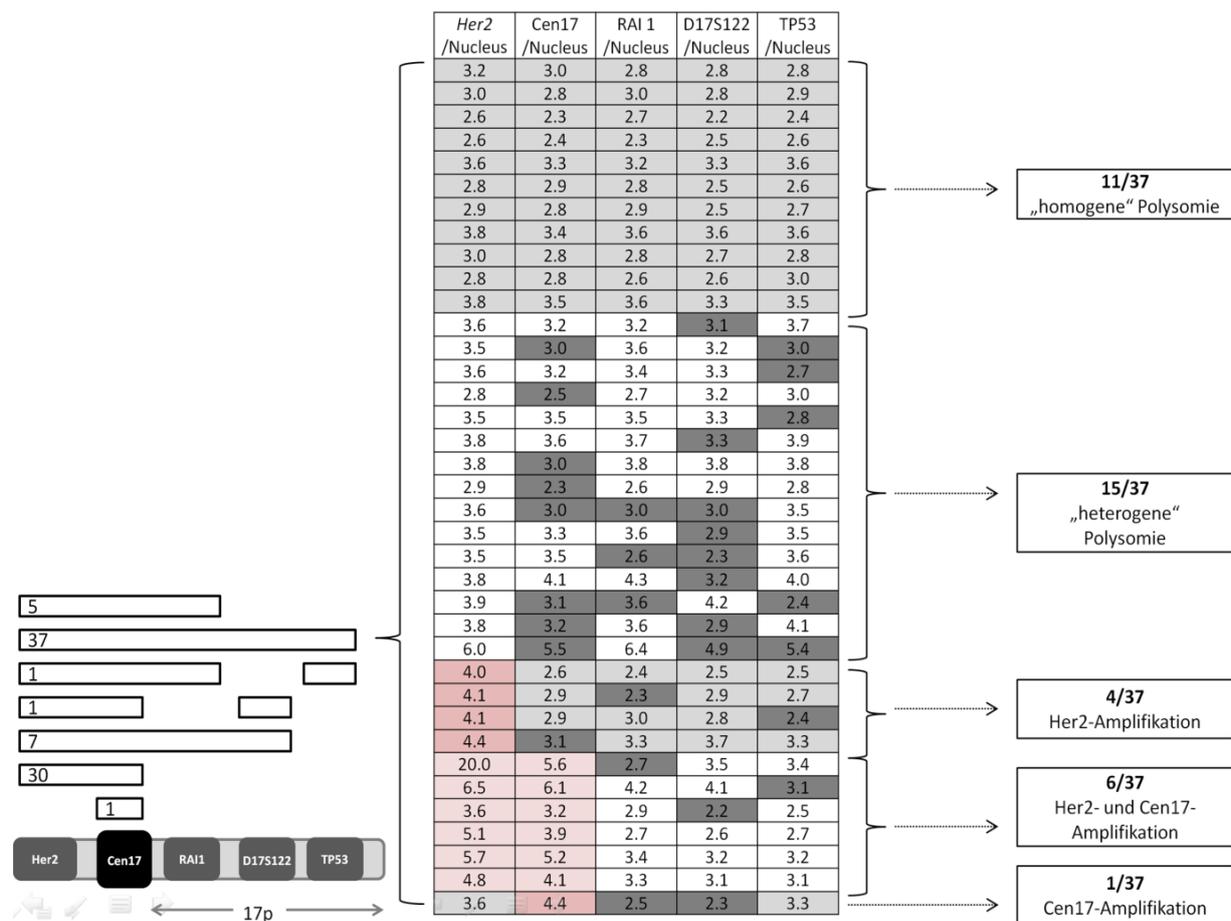


Abbildung 12: 37/82 "echt" polysome Fälle aus potentiell polysomem Tumorkollektiv

In 29,7% (11/37) zeigen alle fünf Marker nahezu identische Zugewinne ("homogene" Polysomie 17).

In 40,1% (15/37) liegen Markerhäufigkeiten vor, die um mehr als 0,5 Signale von jeweils fallinternen Markerzahlen abweichen ("heterogene" Polysomie 17).

In 10,8% (4/37) zeigt Her2 einen deutlich höheren Zugewinn als die übrigen Marker (dunkelrot, Her2-Amplifikation).

Dabei liegen nur in 1 aus 4 Fällen die anderen Marker ähnlich vermehrt vor, was eine zusätzliche Her2-Amplifikation nahelegt. In 3 aus 4 Fällen zeigt jeweils ein Marker fallinterne Signalabweichungen > 0,5.

In 16,2% (6/37) zeigen Her2 und Cen17 deutlich höhere Zugewinne als die übrigen Marker (hellrot, Her2- und Cen17-Amplifikation).

Dabei liegen in 3 aus 6 Fällen die anderen Marker ähnlich vermehrt vor, was eine zusätzliche Cen17-Koamplifikation neben der Her2-Amplifikation wahrscheinlich macht. In 3 aus 6 Fällen zeigt jeweils ein Marker fallinterne Signalabweichungen > 0,5.

In 2,7% (1/37) Fällen dominiert das Cen17-Signal (dunkelrot, Cen17-Amplifikation), was eine alleinige Amplifikation von Cen17 nahelegt, jedoch weisen zwei Marker einen Signalunterschied > 0,5 auf.

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

In 3/78 Fällen zeigen alle Marker Zugewinne: Dabei findet sich in 1/3 Fällen neben der Her2-Amplifikation eine nahezu homogene Vermehrung der restlichen Marker. Es liegt womöglich eine "homogene" Polysomie 17 mit zusätzlicher Her2-Amplifikation vor.

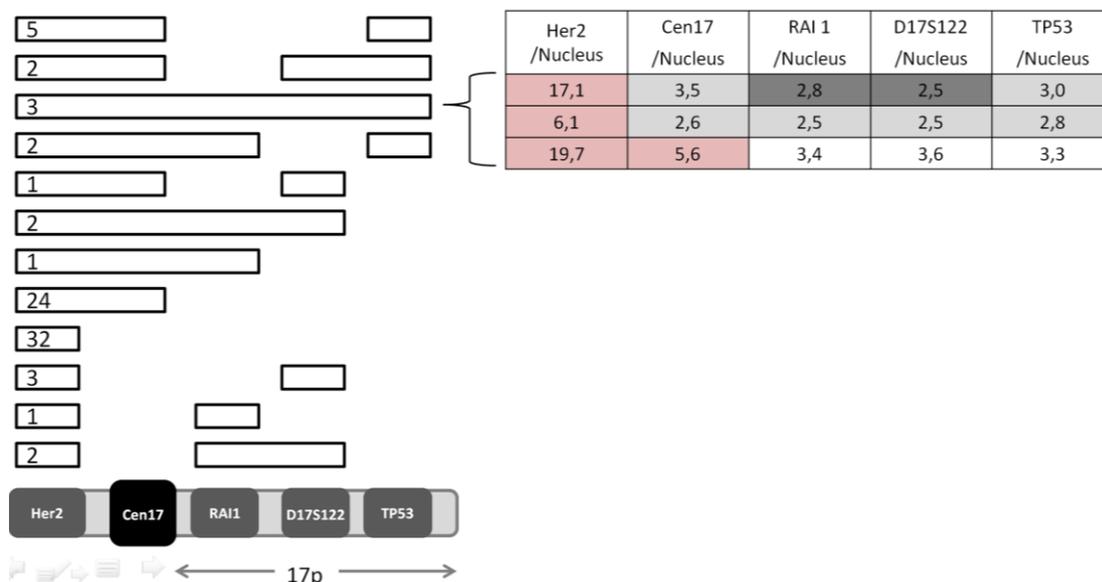


Abbildung 13: 3/78 "echt" polysome Fälle aus Her2-positivem Tumorkollektiv

In 1/3 liegt neben der Her2-Amplifikation (rot) ein heterogener Zugewinn (dunkelgrau) der restlichen Marker vor. In 1/3 zeigen vier Marker nahezu identische Zugewinne. In 1/3 liegt neben der Her2-Amplifikation zusätzlich eine Cen17-Koamplifikation (rot) vor.

2.2.5 Zentromerzugewinne

Zentromerzugewinne finden sich in dieser Studie ausschließlich im Her2-positiven und potentiell polysomen Tumorkollektiv.

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

Die Tumorgewebe mit einer alleinigen, fokalen Vermehrung der Cen17-Signale erfordern besondere Betrachtung, da diese Fälle fälschlicherweise als polysom interpretiert werden: Die Her2/Cen17 Ratio ist aufgrund einer erhöhten Zahl von Cen17 erniedrigt ($< 2,0$) und könnte eine mögliche Her2-Amplifikation verbergen. Mithilfe der drei 17p-Marker D17S122, RAI1 und TP53 soll eine Abgrenzung zwischen "echter" und "falscher" Polysomie (Cen17-Ko-Amplifikation) vorgenommen werden:

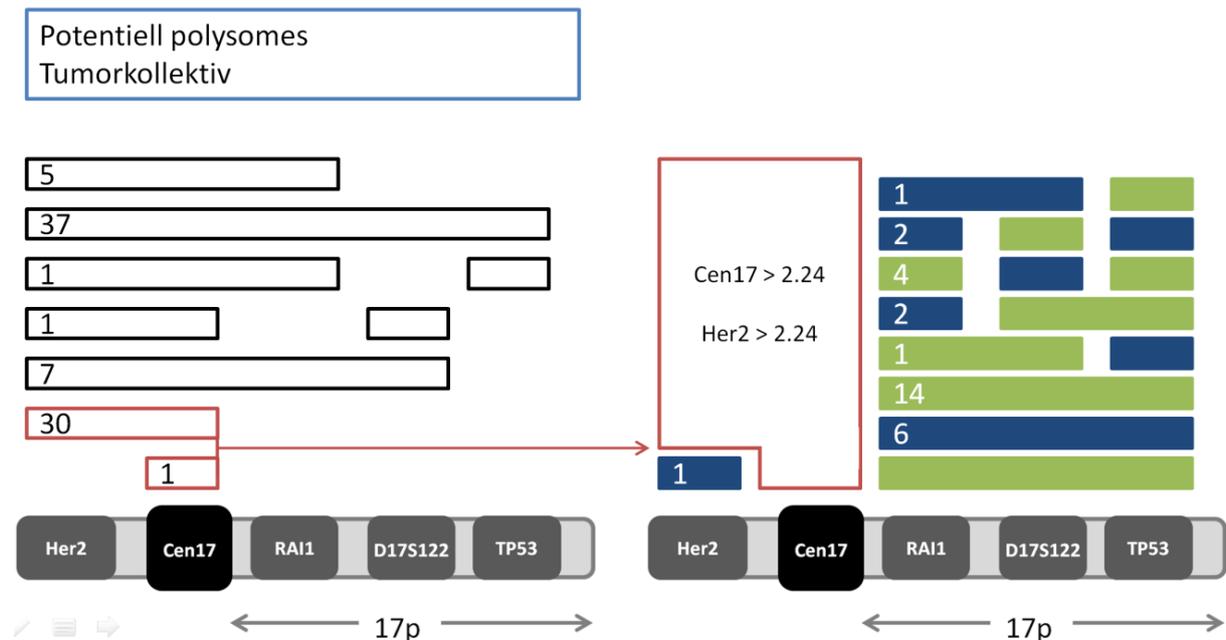


Abbildung 14: 31/82 Cen17-koamplifizierte Fälle aus potentiell polysomem Tumorkollektiv

Deletionen sind dunkelblau gekennzeichnet.

In 1/31 zeigen D17S122 und RAI1 Verluste (dunkelblau) bei normalem TP53 (grün).

In 2/31 liegen TP53 und RAI1 deletiert vor bei normalem D17S122.

In 4/31 findet sich ausschließlich D17S122, in 2/31 RAI1 und in 1/31 TP53 deletiert.

In 6/31 zeigen alle 17p-Marker Verluste.

In 14/31 Fällen liegen alle 17p-Marker im Normbereich, Cen17 und Her2 zeigen Zugewinne.

In 1/31 zeigt ausschließlich Cen17 Zugewinne, alle übrigen Marker - inklusive Her2 - liegen normal vor.

In 16/31 Zentromerzugewinn-Fällen liegt mindestens ein Marker deletiert vor. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine fokale Cen17-Koamplifikation handelt, ist umso

höher, je mehr der übrigen Marker normal vorliegen. Aufgrund offensichtlicher Deletionen der 17p-Marker ist in 16 Fällen daher keine Aussage über eine Cen17-Koamplifikation möglich.

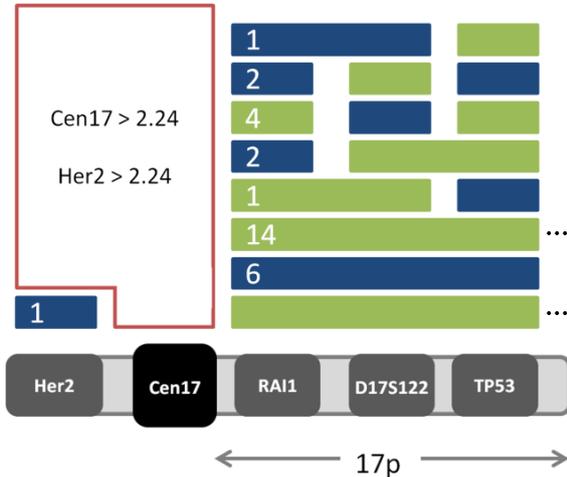


Abbildung 15: 15/82 Cen17-koamplifizierte Fälle im potentiell polysomen Tumorkollektiv

Dagegen zeigen in 15/31 alle 17p-Marker weder Verluste noch Zugewinne, sondern liegen im Normbereich (circa zweifach pro Zellkern) vor. Dies suggeriert eine alleinige Cen17-Koamplifikation, was diagnostisch fälschlicherweise als Polysomie interpretiert werden könnte. Somit liegt in 15/82 (18,3%) des potentiell polysomen Tumorkollektivs mit hoher Wahrscheinlichkeit eine solitäre Cen17-Amplifikation vor.

Die folgende Tabelle zeigt, wie sich die Cen17-Koamplifikation dieser 15 Fälle auf die Interpretation des Her2-Status auswirkt:

ID	Cen17/ Nucleus	HER2/ Nucleus	TP53/ Nucleus	RAI1/ Nucleus	D17S122/ Nucleus	Her2/ Cen17	HER2/ TP53	HER2/ RAI1	HER2/ D17S122
1	3.32	2.13	2.08	2.08	1.84	0.64	1.02	1.02	1.16
2	2.84	3.00	2.16	1.96	2.08	1.06	1.39	1.53	1.44
3	3.53	3.57	1.80	1.85	2.00	1.01	1.98	1.93	1.79
4	2.92	3.44	1.76	1.85	1.72	1.18	1.95	1.86	2.00
5	3.28	3.75	1.88	1.92	1.92	1.14	1.99	1.95	1.95
6	3.38	3.53	2.24	1.96	1.88	1.04	1.58	1.80	1.88
7	2.90	2.83	1.87	1.88	1.92	0.98	1.51	1.51	1.47
8	3.02	3.49	1.64	1.92	1.96	1.16	2.13	1.82	1.78
9	4.60	4.41	2.00	2.08	2.04	0.96	2.21	2.12	2.16
10	3.40	3.76	1.93	1.93	2.00	1.11	1.95	1.95	1.88
11	4.26	13.53	1.80	1.92	1.92	3.18	7.52	7.05	7.05
12	4.98	6.28	2.00	2.00	2.08	1.26	3.14	3.14	3.02
13	3.32	5.75	1.84	1.96	1.88	1.73	3.13	2.93	3.06
14	6.80	9.18	2.24	2.28	2.05	1.35	4.10	4.03	4.48
15	2.30	2.73	1.84	1.96	2.00	1.19	1.48	1.39	1.37

Her2-positiv zweifelhaft

Abbildung 16: 15/82 "echt" Cen17-koamplifizierte Fälle des potentiell polysomen Tumorkollektivs

Hinsichtlich der absoluten Her2-Kopienzahl werden 3/15 als positiv (ID 11, 12 und 14: Her2/Zellkern $\geq 6,0$) und zwei Fälle (ID 9 und 13: Her2/Zellkern 4,0 - 6,0) als zweifelhaft eingestuft.

Die Her2/Cen17 Ratio identifiziert lediglich einen positiven Fall (ID 11), die restlichen 14 Fälle sind alle negativ.

Die Marker-Ratios der drei alternativen 17p-Marker hingegen stufen 8/15 als Her2-negativ und 7/15 (ID 4, 8, 9, 11, 12, 13 und 14) als Her2-positiv (Her2/Marker-Ratio $\geq 2,0$) ein: Dabei sind in 5/7 alle und in 2/7 jeweils eine (ID 4, 8) Marker-Ratio $\geq 2,0$.

So werden neben den drei ohnehin positiven Fälle (aufgrund der Her2-Kopienzahl) vier weitere Fälle von den 17p-Markern als Her2-positiv identifiziert. Darunter befinden sich zudem die zuvor von Cen17 als zweifelhaft klassifizierten Fälle, sodass kein einziger zweifelhafter Fall unter den 17p-Markern entsteht.

Zusammenfassend fällt auf, dass die Her2/Cen17 Ratio 6 aus insgesamt 7 Her2-positiven Fällen als Her2-negativ einstuft und diesen somit den Zugang zu einer anti-Her2 Therapie verwehrt. Außerdem stuft Cen17 im Gegensatz zu den 17p-Markern zwei Fälle als zweifelhaft ein, sodass diese bezüglich Therapie-Procedure unklaren und deshalb schwierig zu führenden Fälle nicht eliminiert werden.

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

Besonders Her2-amplifizierte Fälle sind gefährdet, nicht als Her2-positiv eingestuft zu werden, wenn erhöhte Cen17-Signale die Her2/Cen17 Ratio erniedrigen.

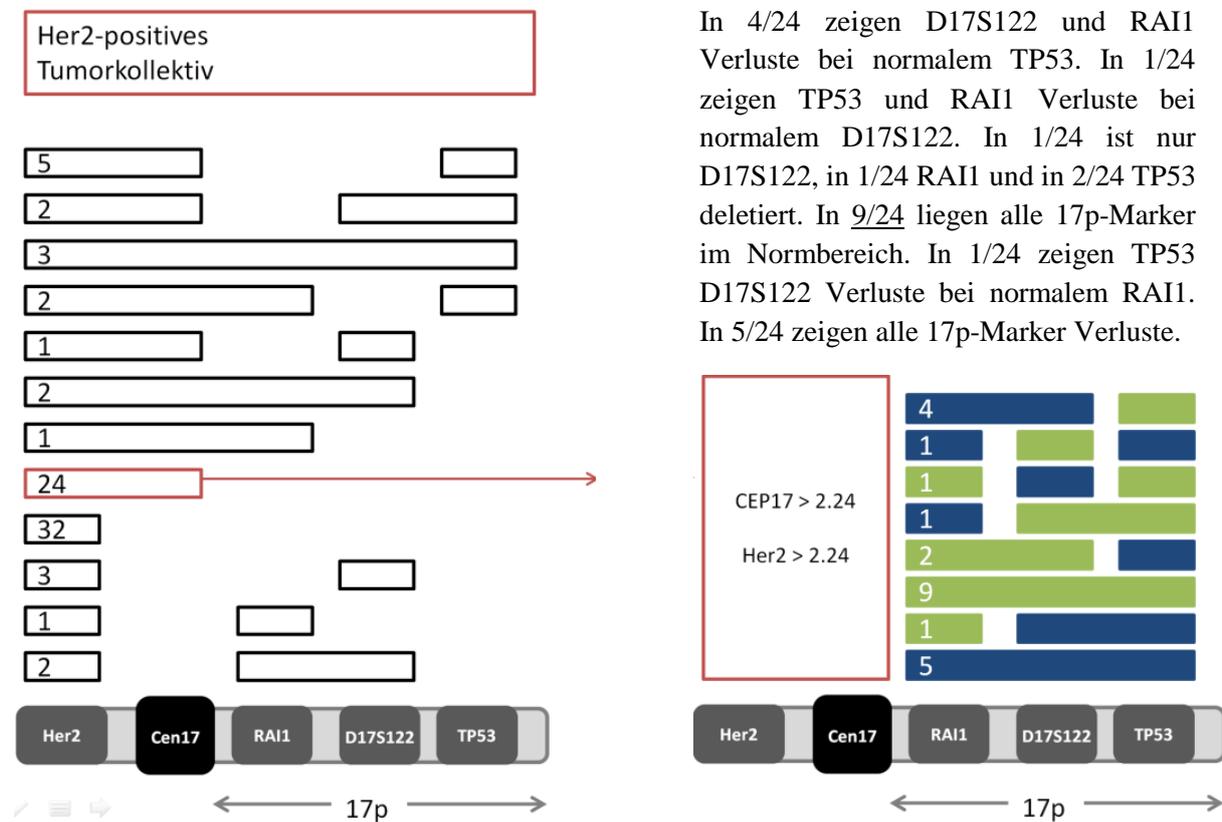


Abbildung 17: 24/78 Cen17-koamplifizierte Fälle im Her2-positiven Tumorkollektiv

In 9/24 (auf das ganze Her2-positive Tumorkollektiv bezogen: $9/78 = 11,5\%$) findet sich neben der Her2-Amplifikation wahrscheinlich eine Cen17-Koamplifikation, da die übrigen 17p-Marker alle im Normbereich liegen. Diese perizentrische Amplifikation wirkt sich in diesen Fällen aber nicht auf die Therapieentscheidung aus: Alle neun Fälle werden trotz der Cen17-Koamplifikation von der Her2/Cen17 Ratio als Her2-positiv eingestuft. Ein Zusammenhang zwischen einer Cen17-Koamplifikation und einer daraus folgenden Kaschierung einer Her2-Amplifikation ist in diesem Kollektiv somit nicht auszumachen.

Unter den 24 Cen17-koamplifizierten Fällen findet sich ein zweifelhafter Fall, der den 5/24 Fällen zugehörig ist, bei denen alle 17p-Marker deletiert vorliegen. Besonders dieser Fall wäre diagnostisch interessant, da womöglich eine Reklassifikation unter den 17p-Markern stattfinden würde. Jedoch kann aufgrund der drei deletierten 17p-Marker in diesem Fall nur über eine Cen17-Koamplifikation spekuliert werden.

2.2.6 Zweifelhafte Fälle ("equivocals")

Zweifelhafte Fälle finden sich in dieser Studie ausschließlich im potentiell polysomen und Her2-positiven Tumorkollektiv.

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

16/82 Fälle (19,5%) werden von der PathVysion-Sonde Her2/Cen17 als zweifelhaft (Her2/Cen17 < 2,0, Her2/Zellkern zwischen 4,0 - 6,0) eingestuft:

Her2/ Zellkern	Her2/ RAI1	Her2/ D17S122	Her2/ TP53	Her2/ Cen 17
5,7	2,9	2,8	3,4	1,8
4,3	2,6	2,4	2,5	1,2
4,0	3,1	2,4	3,0	1,4
4,5	2,5	2,4	2,5	1,9
4,4	2,2	2,4	2,0	0,9
4,5	1,1	2,2	2,3	1,1
5,2	1,3	2,2	2,8	1,2
4,8	1,5	1,7	2,3	1,1
4,7	2,0	1,9	2,2	1,3
4,8	1,5	1,4	1,6	1,2
5,1	1,8	1,9	2,0	1,3
5,7	2,0	1,4	1,9	1,2
4,1	1,8	1,6	1,3	1,3
4,1	1,3	1,6	1,6	1,3
4,4	1,3	1,2	1,3	1,4
4,0	1,6	1,7	1,7	1,6

In allen 16 Fällen führt die Berechnung der Her2/Cen17 Ratio zum Ergebnis "Her2-negativ" (Her2/Cen17 < 2,0). Die 17p-Marker-Ratios stufen 31,3% (5/16: RAI1), 37,5% (6/16: D17S122) und 56,3% (9/16: TP53) als Her2-positiv (grau) ein, was die zweifelhaften Proben im Fall von TP53 um mehr als die Hälfte reduziert. Schwarz markierte Ratios liegen aufgrund von Deletionen des jeweiligen Markers erhöht vor und sind somit nicht verwendbar.

Tabelle 5: 16/82 zweifelhafte Fälle aus dem potentiell polysomen Tumorkollektiv

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

2/78 Fälle werden von der PathVysion-Sonde Her2/Cen17 als zweifelhaft eingestuft:

Fälle	Cen17/ Zellkern	Her2/ Zellkern	TP53/ Zellkern	RAI 1/ Zellkern	D17S122/ Zellkern	Her2/ Cen17	Her2/ TP53	Her2/ RAI1	Her2/ D17S122
1	3,56	4,88	3,56	3,16	2,04	1,47	1,62	1,47	2,05
2	3,56	4,88	1,44	1,72	0,52	1,51	3,44	3,23	7,85

Tabelle 6: 2/78 zweifelhafte Fälle aus dem Her2-positiven Tumorkollektiv

In Fall 1 zeigen Her2, Cen17, RAI1 und TP53 einen Zugewinn (grau), nur D17S122 liegt im Normalbereich vor. Entsprechend stuft die Her2/D17S122 Ratio den Fall positiv ein.

In Fall 2 liegt wahrscheinlich eine Cen17-Koamplifikation vor. Läge ein normales Cen17-Signal vor, wäre die Her2/Cen17 Ratio nicht erniedrigt und der Fall wäre Her2-positiv. Da jedoch die 17p-Marker deletiert (schwarz) vorliegen, ist eine reliable Bestimmung des Her2-Status auf Basis einer Marker-Ratio nicht sinnvoll.

2.2.7 "Marker-Kombinations-Score"

Auch wenn die Zentromer-Region durch die angewandte aCGH nicht abgedeckt wurde, erscheint es evident, dass der Cen17-Hybridisierungsmarker im FISH-Ansatz eine chromosomale Region erfasst, die eher die Häufigkeit des langen als des kurzen Arms widerspiegelt.

Demzufolge wurde in dieser Arbeit (rein analytisch, d. h. rechnerisch) Cen17 als ein auf 17q lokalisierter Marker angesehen, wohingegen jeweils einer der drei alternativen Marker RAI1, TP53 und D17S122 repräsentativ für 17p steht. Die Tatsache, dass 17q tendenziell eher Zugewinne und 17p Verluste zeigen, unterstreicht, dass der aus beiden gebildete Mittelwert ein adäquater Referenzwert für die wahre Häufigkeit von Chromosom 17 wäre: So könnten sich rechnerisch Verluste von 17p und Zugewinne von 17q gegenseitig ausgleichen.

Die Anwendung eines "Kombinations-Score" unter Verwendung von Triple-Sonden, die einen 17p-Marker und einen 17q-Marker einschließen, könnte durch einen adäquateren Bezugswert für die Anzahl des Chromosoms 17 letztlich die diagnostische Bestimmung des Her2-Status erleichtern.

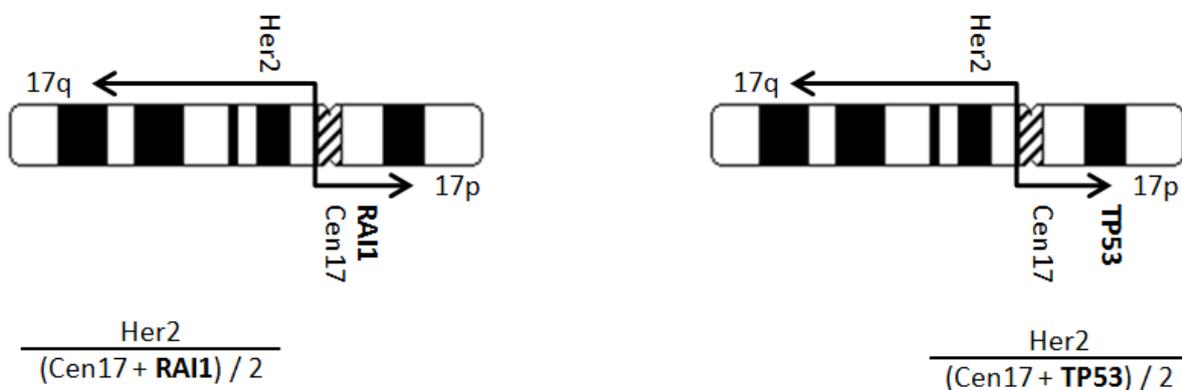


Abbildung 18: Berechnung des "Marker-Kombinations-Score"

Der Pfeil in der Abbildung deutet die Zugehörigkeit von Cen17 zu 17q an. Für die Berechnung des "Marker-Kombinations-Score" können ausschließlich Daten, die mit Triple-Sonden (Her2/Cen17/RAI1 und Her2/Cen17/TP53) evaluiert wurden, herangezogen werden. So können alle drei Markersignale aus demselben Zellkern gleichzeitig verglichen werden. Die Dual-Sonde Her2/D17S122 scheidet damit aus.

Der "Marker-Kombinations-Score" wurde auf alle 16/82 zweifelhaften Fälle des potentiell polysomen Tumorkollektivs - bestimmt durch die PathVysion-Sonde Her2/Cen17 - angewandt:

Her2/ nucleus	Her2/ [[RAI1+cen17] /2]	Her2/ [[TP53+cen17]/2]
5,7	2,2	2,2
4,3	1,5	1,5
4,0	2,0	2,0
4,5	2,2	2,1
4,4	1,3	1,3
4,5	1,1	1,4
5,2	1,1	1,6
4,8	1,2	1,5
4,7	1,5	1,5
4,8	1,3	1,3
5,1	1,5	1,5
5,7	1,3	1,4
4,1	1,6	1,5
4,1	1,4	1,5
4,4	1,4	1,4
4,0	1,6	1,6

Der "Marker-Kombinations-Score" mit RAI1 stuft 1/16 der zweifelhaften Fälle als positiv (grau) ein.

Bei 2/16 ist der Score fälschlicherweise erhöht (schwarz), da RAI1 deletiert vorliegt.

Der "Marker-Kombinations-Score" mit TP53 stuft 2/16 der zweifelhaften Fälle als positiv (grau) ein.

Bei 1/16 ist der Score fälschlicherweise erhöht (schwarz), da TP53 deletiert vorliegt.

Tabelle 7: "Marker-Kombinations-Score" der 16/82 zweifelhaften Fälle des potentiell polysomen Tumorkollektivs

Sowohl der "Marker-Kombinations-Score" mit RAI1 als auch mit TP53 ergibt bei 1/16 Fällen (6,3%) das Resultat "Her2-positiv" ($\text{Her2/Marker-Ratio} \geq 2,0$). Der "Kombinations-Score" aus Cen17 und TP53 führt bei insgesamt zwei Proben zum Ergebnis "Her2-positiv". Insgesamt bleiben 14/16 Fälle (87,5%) zweifelhaft, während in 12,5% (2/16) eine Reduktion der zweifelhaften Fälle mithilfe des "Marker-Kombinations-Score" vorgenommen wird.

2.2.8 aCGH-Daten

Bei molekularzytogenetischen Methoden wie der FISH kann zwar mit hoher Auflösung und auch quantitativ gearbeitet werden, der betroffene Bereich des Genoms muss jedoch genau bekannt sein. Die Methode der Microarray-basierten, komparativen, genomischen Hybridisierung hingegen ermöglicht eine Abdeckung des gesamten Genoms und wurde 1997 von Solinas-Toldo et al. am DKFZ in Heidelberg entwickelt [94]. Die Array-CGH ist als Weiterentwicklung der vergleichenden Genomhybridisierung (konventionelle CGH) eine hochauflösende, molekulare Untersuchungsmethode, welche die genomweite Detektion von submikroskopischen Chromosomenveränderungen wie Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen sowie die genaue Bestimmung von chromosomalen Bruchpunkten erlaubt. Gegen ein Raster von immobilisierten, definierten DNA-Fragmenten (Matrix oder DNA-Chip) wird eine vergleichende genomische Hybridisierung durchgeführt und das Verhältnis der Fluoreszenzsignale der Patienten- und Referenz-DNA bestimmt. Die Anzahl und die Dichte der Fragmente auf dem Array bestimmen die Auflösung der aCGH.

In dieser Studie wurden 11 Proben einer aCGH unterzogen:

- 8/11: Cen17-koamplifizierte Fälle aus dem potentiell polysomen Tumorkollektiv
- 1/11: Kontrolle aus dem benignen Gewebekollektiv
- 2/11: Her2-positive Fälle aus dem Her2-positiven Tumorkollektiv

Exemplarisch werden nachfolgend die Daten zu den wichtigsten sieben Stanzen gezeigt:

- 1/7: Kontrolle aus dem benignen Gewebekollektiv
- 6/7: Cen17-koamplifizierte Fälle aus dem potentiell polysomen Tumorkollektiv

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der übrigen Stanzen (4/11) befinden sich im Anhang (siehe Abschnitt 3.5).

PROBE AUS BENIGNEM GEWEBEKOLLEKTIV

Die nachfolgenden Abbildungen enthalten jeweils ein aCGH-Profil des Chromosoms 17 sowie die zugehörigen FISH-Daten.

Die Darstellung von Chromosom 17 zeigt relative Zugewinne (rot) und Verluste (grün), welche stets in Bezug auf die Ploidie des gesamten Genoms interpretiert werden. Da Tumorzellen häufig aneuploide oder polyploide Chromosomensätze tragen, kann nicht direkt auf die tatsächlich vorliegende Kopienzahl zurückgeschlossen werden. Zeigt 17p beispielsweise einen Verlust, bedeutet dies, dass hier ein im Vergleich zur Häufigkeit des restlichen Genoms relativer Verlust von 17p vorliegt: z. B. im Falle eines diploiden Chromosomensatzes der Tumorzellen eine Kopie der 17p-Region und zwei Kopien der 17q-Region oder bei tetraploidem Chromosomensatz 2 Kopien der 17p- und 4 Kopien der 17q-Region. Eine Aussage über eventuelle Polyploidie kann somit nicht allein anhand der aCGH-Daten, sondern nur in Zusammenschau mit den zugehörigen FISH-Daten getroffen werden.

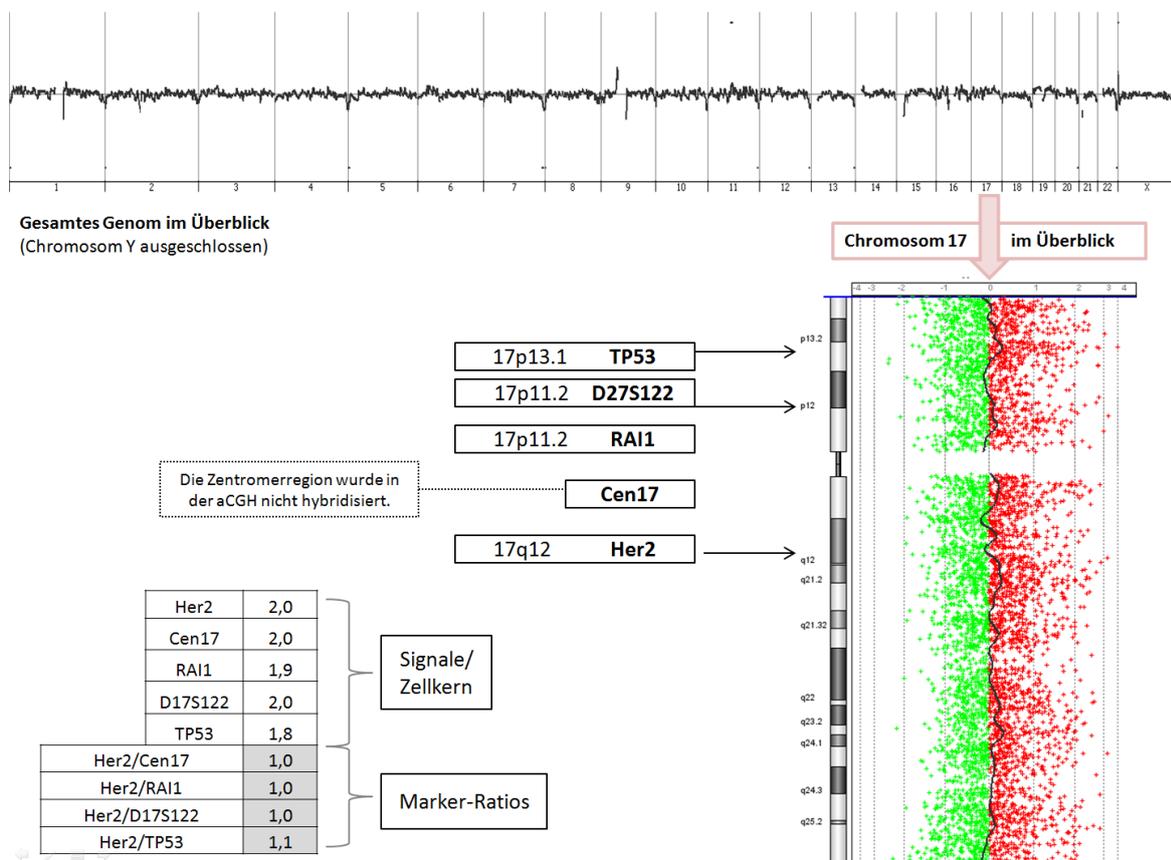


Abbildung 19: Benigne Kontrolle (Stanze E, 18403/06)

Sowohl Chromosom 17 als auch das übrige Genom dieser benignen Probe zeigen keine signifikanten Aberrationen. Alle Chromosom 17-Marker weisen FISH-Werte von circa 2,0 auf und die Her2/Marker-Ratios betragen jeweils rund 1,0.

Dies steht in hoher Konkordanz mit den zugehörigen aCGH-Ergebnissen.

CEN17-KOAMPLIFIZIERTE FÄLLE AUS POTENTIELL POLYSOMEM TUMORKOLLEKTIV

PROBE 1

Der lange Arm von Chromosom 17 zeigt einen relativen Zugewinn (Her2 und Cen17 jeweils $> 3,2$), wohingegen der kurze Arm nicht signifikant verändert vorliegt. Dies steht in hoher Konkordanz mit den FISH-Werten (TP53, RAI1 und D17S122: 1,9 Signale/Nucleus).

Auf Basis der Her2/Cen17 Ratio (= 1,2) ist die Probe 1 Her2-negativ. Auch die Her2/Zellkern-Kopienzahl ($< 4,0$) nimmt die Klassifizierung negativ vor. Dagegen führen alle anderen 17p-basierten Marker-Ratios (= 2,0) bei dieser Probe zum Ergebnis "Her2-positiv".

Ähnliche FISH-Zählwerte für Her2 und Cen17 legen nahe, dass Cen17 eher zu 17q gehört. Jedoch kann diese Vermutung nicht sicher durch die vorliegende aCGH bestätigt werden, da das verwendete Mikroarray keine Oligonukleotidproben für die Zentromer-Region abdeckt.

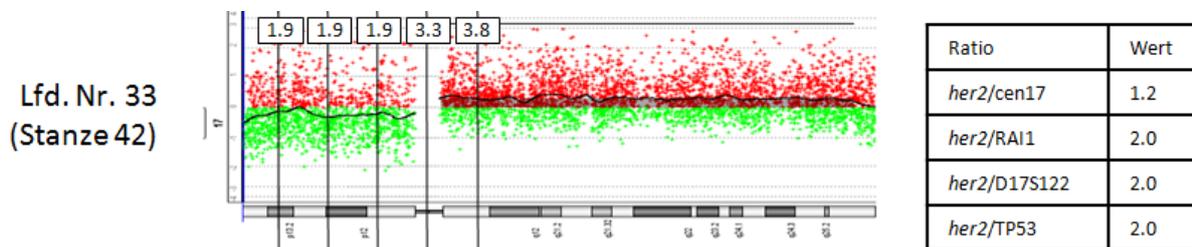


Abbildung 20: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 33)

PROBE 2

Chromosom 17 zeigt einen relativen Verlust von 17p und einen nicht alterierten langen Arm 17q. Da sich in der aCGH ein niedrigeres DNA-Level für 17p abzeichnet, müssten die zugehörigen FISH-Werte der 17p-Marker im Falle einer Diploidie $< 2,0$ vorliegen. Hingegen werden 17p-FISH-Werte von 2,0 als relativer Verlust angezeigt. Die Zusammenschau von aCGH- und FISH-Daten impliziert, dass eine Polyploidie vorliegen könnte: Her2- und Cen17-FISH-Werte von $> 3,4$, die - verglichen mit dem übrigen Genom - keinen relativen Zugewinn darzustellen scheinen, könnten Hinweis auf eine Triploidie des gesamten Genoms sein.

Obwohl die Marker-Ratios von TP53, RAI1 und D17S122 aufgrund von Deletionen erhöht sind, wird der Schwellenwert von 2,0 nicht erreicht. Die Probe wird auf Basis aller Marker als Her2-negativ eingestuft. Auch hier wird anhand ähnlicher FISH-Werte für Her2 und Cen17 deutlich, dass Cen17 eher den langen Arm 17q zu repräsentieren scheint.

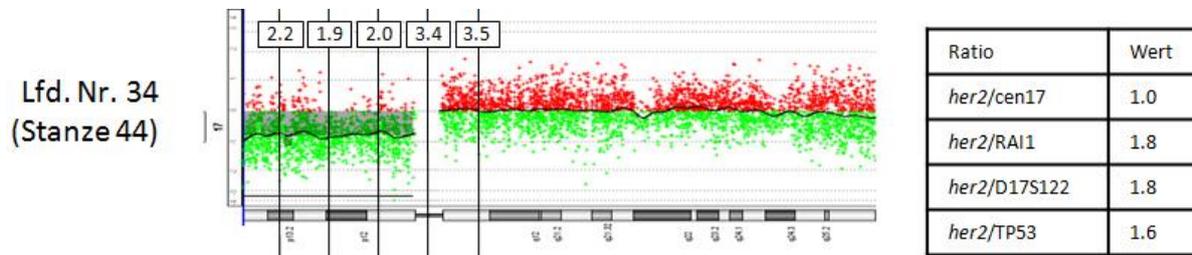


Abbildung 21: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 34)

PROBE 3

Chromosom 17 zeigt einen relativen Zugewinn von 17q und einen nicht alterierten kurzen Arm 17p, was in hoher Konkordanz mit den FISH-Signalen steht (RAI1, D17S122 und TP53: jeweils circa 2,0). Der Zugewinn von 17q scheint über das Zentromer hinauszu gehen und zusätzlich die perizentrische Region von 17p einzuschließen, was die niedrige Her2/Cen17 Ratio von 1,1 erklärt und die Zugehörigkeit von Cen17 zu 17q unterstreicht.

Ratiowerte der 17p-Marker sind höher als die Her2/Cen17 Ratio, überschreiten aber nicht den 2,0-Grenzwert: Die Probe bleibt Her2-negativ.

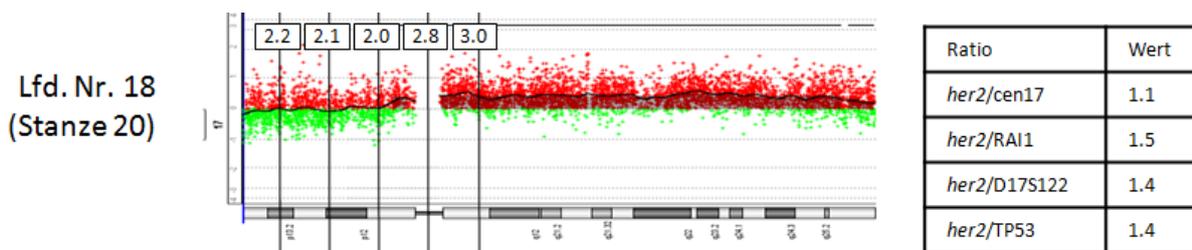


Abbildung 22: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 18)

PROBE 4

Chromosom 17 zeigt einen relativen Verlust des kurzen Arms 17p und einen Zugewinn des langen Arms 17q. Der Zugewinn von 17q umspannt die Cen17- und perizentrische Region, was die Zugehörigkeit von Cen17 zu 17q unterstreicht.

Der Her2-Status von Probe 4 ist zweifelhaft (Her2/Nucleus-Zahl 4,0 - 6,0). Eine alleinige Betrachtung der Her2/Cen17 würde die Probe als Her2-negativ einstufen, wohingegen mithilfe aller 17p-Marker-Ratios eine positive Kategorisierung vorgenommen werden würde. Die Marker-Ratios sind jedoch aufgrund von auf die Ploidie der Tumorzellen bezogenen Deletionen aller 17p-Marker fälschlicherweise erhöht und deshalb nicht verwertbar. Da Cen17 (= 3,3) amplifiziert vorliegt, ist die Her2/Cen17 Ratio erniedrigt und ebenfalls nicht verwertbar.

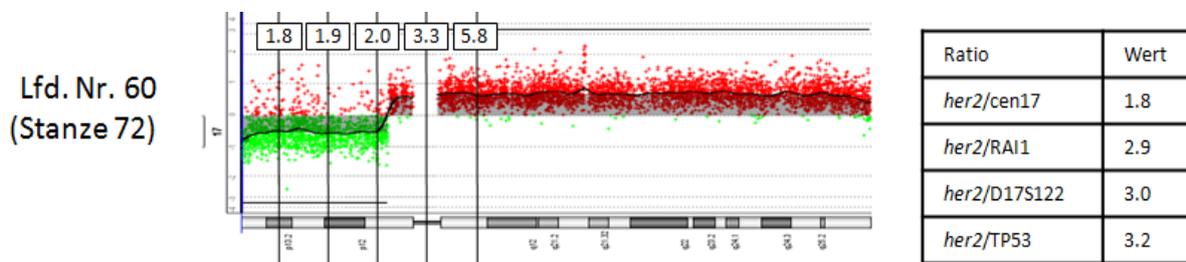


Abbildung 23: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 60)

An dieser Stelle ist die Anwendung des "Marker-Kombinations-Score" hilfreich:

Aus TP53 oder RAI1, jeweils repräsentativ für 17p, und Cen17, repräsentativ für 17q, wird ein Mittelwert gebildet, wodurch sich 17p-Verluste und 17q-Zugewinne ausgleichen und somit eine bessere Annäherung an die tatsächliche Ploidie der Tumorzellen erreicht wird. Der entstandene Referenzwert für die Häufigkeit von Chromosom 17 wird ins Verhältnis zu Her2 gesetzt.

Sowohl der "Marker-Kombinations-Score" mit RAI1 als auch mit TP53 führt bei dieser zuvor zweifelhaften Probe zum Befund Her2-positiv.

Her2/ Zellkern	Cen17/ Zellkern	RAI1/ Zellkern	D17S122/ Zellkern	TP53/ Zellkern	Her2/ [(TP53+Cen17)/2]	Her2/ [(RAI1+Cen17)/2]
5,8	3,3	2	1,9	1,8	2,3	2,2

Tabelle 8: "Kombinations-Score" für Lfd. Nr. 60

Für den "Kombinations-Score" können nur Marker verwendet werden, die mit einer Triple-Sonde bestimmt werden. Die Dual-Sonde Her2/D17S122 scheidet aus.

PROBE 5

Chromosom 17 zeigt einen relativen Verlust von 17p und einen Zugewinn von 17q, was in hoher Konkordanz mit den zugehörigen FISH-Werten steht. Die Marker-Ratios der 17p-Marker sind aufgrund von Deletionen erhöht und nicht verwertbar. Die Her2/Cen17 Ratio kann aufgrund einer vermutlichen Amplifikation von Cen17 ebenfalls nicht zur Bestimmung des Her2-Status herangezogen werden. An dieser Stelle ist der "Marker-Kombinations-Score" hilfreich: Dieser führt bei Probe 5 zum Ergebnis Her2-negativ.

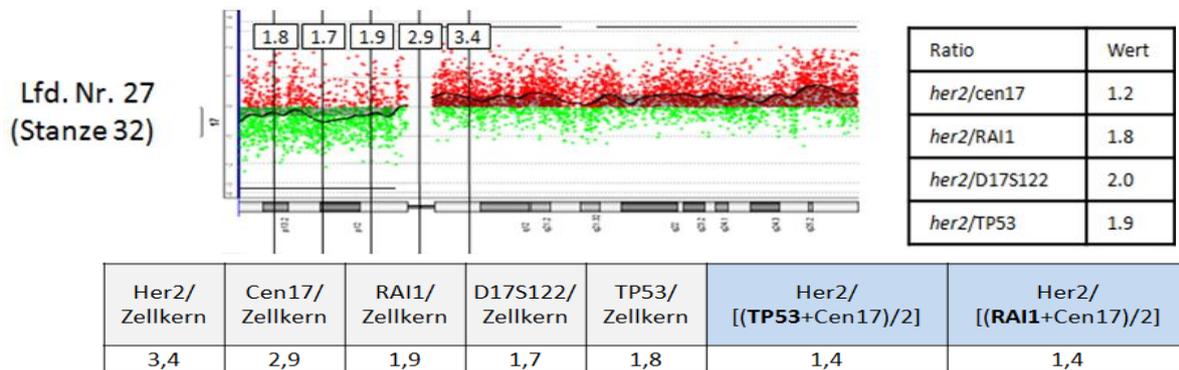


Abbildung 24: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv und "Kombinations-Score" (Lfd. Nr. 27)

PROBE 6

Chromosom 17 zeigt einen relativen Verlust des kurzen und langen Arms, lediglich die Zentromer-Region scheint einen relativen Zugewinn aufzuweisen. Dies steht in Konkordanz mit den erhobenen FISH-Werten (Cen17: 3,3; im Vergleich dazu niedrigere Zählwerte der anderen Marker). Es besteht ein Anhaltspunkt für eine Polyploidie des gesamten Genoms, da in der aCGH deletierte Regionen FISH-Werte von circa 2,0 aufweisen. Alle Marker-Ratios führen bei dieser Probe zum Befund "Her2-negativ", wobei die Her2/Cen17 Ratio aufgrund des Cen17-Zugewinns deutlich niedriger ist als die 17p-Marker-Ratios. Die Probe veranschaulicht, dass eine fokale Cen17-Amplifikation auch allein - ohne gleichzeitige Her2-Amplifikation - auftreten kann.

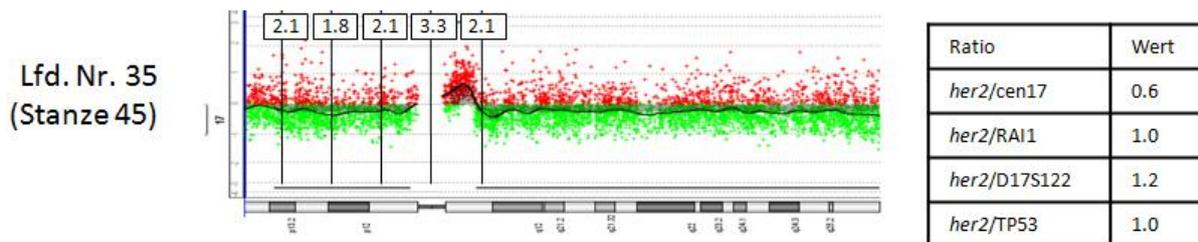
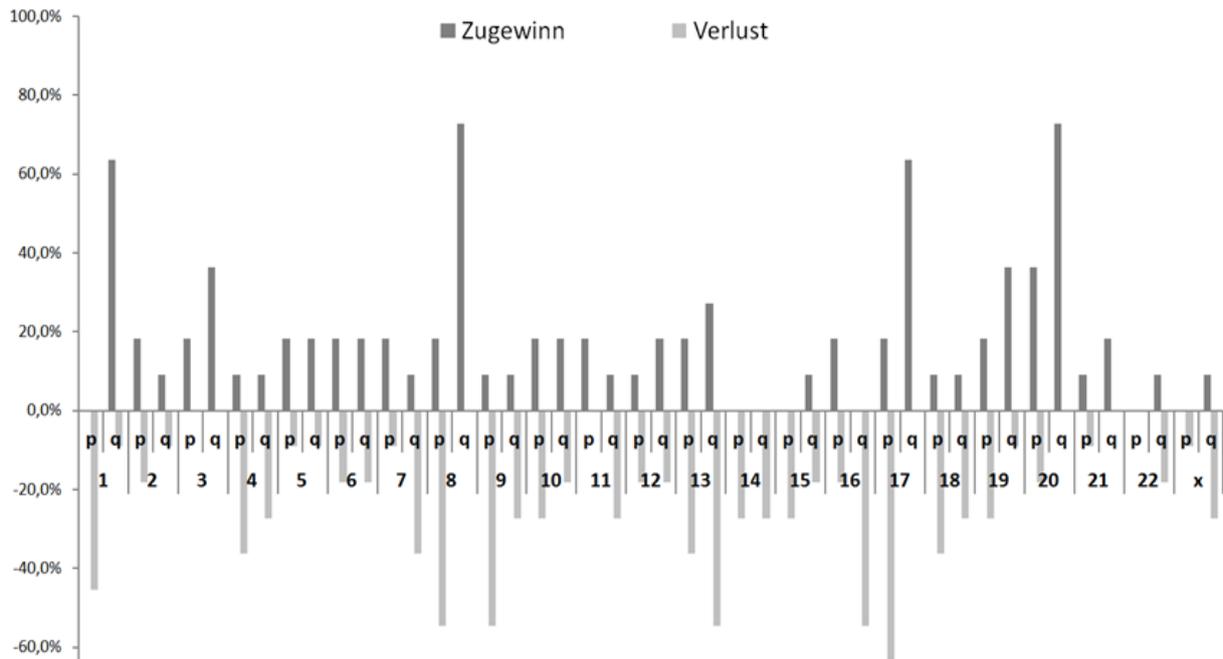


Abbildung 25: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 35)

2.2.9 Chromosomenaberrationen im Überblick

Nachfolgend sind die pangenomischen Chromosomenaberrationen der elf untersuchten aCGH-Proben dargestellt. Die benigne Probe wies keine chromosomalen Aberrationen auf.

Es handelt sich ausschließlich um Brusttumorgewebe:



	1		2		3		4		5		6	
	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
Zugewinn	0,0%	63,6%	18,2%	9,1%	18,2%	36,4%	9,1%	9,1%	18,2%	18,2%	18,2%	18,2%
Verluste	45,5%	9,1%	18,2%	9,1%	0,0%	0,0%	36,4%	27,3%	9,1%	9,1%	18,2%	18,2%
	7		8		9		10		11		12	
	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
Zugewinn	18,2%	9,1%	18,2%	72,7%	9,1%	9,1%	18,2%	18,2%	18,2%	9,1%	9,1%	18,2%
Verluste	9,1%	36,4%	54,5%	0,0%	54,5%	27,3%	27,3%	18,2%	0,0%	27,3%	18,2%	18,2%
	13		14		15		16		17		18	
	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
Zugewinn	18,2%	27,3%	0,0%	0,0%	0,0%	9,1%	18,2%	0,0%	18,2%	63,6%	9,1%	9,1%
Verluste	36,4%	54,5%	27,3%	27,3%	27,3%	18,2%	18,2%	54,5%	63,6%	0,0%	36,4%	27,3%
	19		20		21		22		X			
	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q		
Zugewinn	18,2%	36,4%	36,4%	72,7%	9,1%	18,2%	0,0%	9,1%	0,0%	9,1%		
Verluste	27,3%	9,1%	18,2%	0,0%	9,1%	0,0%	0,0%	18,2%	9,1%	27,3%		

Abbildung 26: Prozentuale Häufigkeit von Chromosomenaberrationen

Die meisten Zugewinne zeigen die langen Arme der Chromosomen 20 und 8 mit jeweils 72,7% sowie 17q und 1q mit jeweils 63,6%. Die häufigsten Verluste zeigen 17p mit 63,6%, gefolgt von 8p, 9p, 13q und 16q mit jeweils 54,5%.

2.2.10 Aneuploidie-Bestimmung mithilfe von Spec21, Spec13 und Cen18

Mithilfe einer Triple-Sonde, die an Zentromer-Regionen von drei weiteren Chromosomen hybridisiert, wurde unter der Annahme, dass diese Zentromere die jeweilige Chromosomenzahl repräsentieren, eine mögliche Polyploidisierung (multiple Polysomie) untersucht. Bei der Triple-Sonde handelt es sich um Chromosom 21-spezifische (Spec21), Chromosom 13-spezifische (Spec13) und Chromosom 18-spezifische (Cen18) Detektions-Kits.

Die Spec13/Cen18/Spec21-Triple-Sonde wurde ausschließlich auf das potentiell polysome und nicht-polysome, nicht-Her2-amplifizierte Tumorkollektiv angewandt:

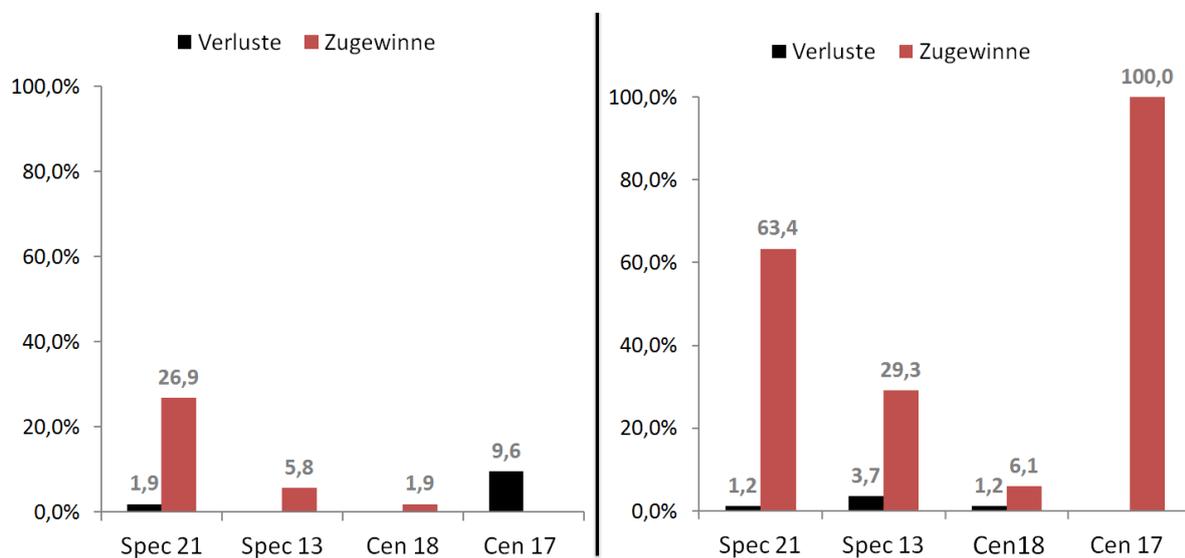


Abbildung 27: Zugewinne und Verluste von Spec21, Spec13, Cen17 und Cen18 im potentiell polysomen (rechts) und nicht-polysomen Tumorkollektiv (links)

Potentiell polysomes Tumorkollektiv (rechts):

Zugewinne: Cen17 in 100% (82/82), Spec21 in 63,4% (52/82), Spec13 in 29,3% (24/82) und Cen18 in 6,1% (5/82)

Verluste: Spec13 in 3,7% (3/82), Spec21 in 1,2% (1/82) und Cen18 in 1,2% (1/82)

Nicht-polysomes, nicht-Her2-amplifiziertes Tumorkollektiv (links):

Zugewinne: Spec21 in 26,9% (14/52), Spec13 in 5,8% (3/52) und Cen18 in 1,9% (1/52)

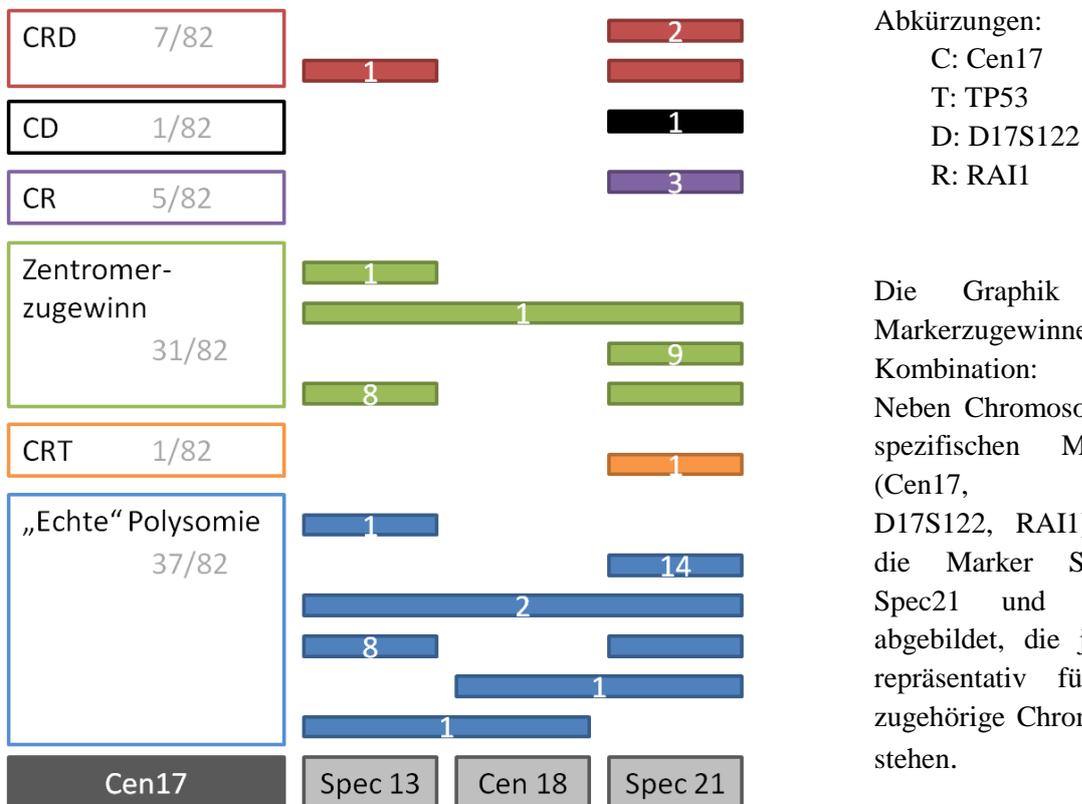
Verluste: Cen17 in 9,6% (5/52) und Spec21 in 1,9% (1/52)

Im Tumorkollektiv mit potentieller Polysomie 17 zeigt das Chromosom 21 mit 63,4% die meisten Aberrationen (Zentromerzugewinne). Am wenigsten Zentromeraberrationen zeigt Chromosom 18.

Im nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten Tumorkollektiv zeigt Chromosom 21 - repräsentiert durch Spec21 - die meisten Aberrationen. Verglichen mit Spec21-/Spec13-/Cen18-Zugewinnen und -Verlusten des potentiell polysomen Tumorkollektivs ist eine relative Übereinstimmung in der Aberrationshäufigkeit der Chromosomen festzustellen. Lediglich die Deletionen entfallen für die Chromosomen 13 und 18 im nicht-polysomen Tumorkollektiv.

MARKERZUGEWINNE IN KOMBINATION

Markerzugewinne in Kombination existieren ausschließlich im potentiell polysomen Tumorkollektiv. Im nicht-polysomen Tumorkollektiv sind Zugewinne von Chromosom 17-Markern zu vernachlässigen, gleichzeitige Markerzugewinne in Kombination von Spec21, Spec13 und Cen18 gibt es nicht.



Die Graphik zeigt Markerzugewinne in Kombination: Neben Chromosom 17-spezifischen Markern (Cen17, TP53, D17S122, RAI1) sind die Marker Spec13, Spec21 und Cen18 abgebildet, die jeweils repräsentativ für das zugehörige Chromosom stehen.

Abbildung 28: Markerzugewinne für potentiell polysomes Tumorkollektiv

Interessant sind die 37/82 Fälle, in denen eine "echte" Polysomie des Chromosom 17 vermutet wird und Polysomie 17 möglicherweise mit einer Polyploidie des gesamten Genoms einhergeht: In 2/37 Fällen zeigen die Chromosomen 13, 21 und 18 gleichzeitig einen Zugewinn. Möglicherweise handelt es sich um einen polyploiden Chromosomensatz, da alle vier untersuchten Chromosomen 13, 18, 21, 17 vermehrt vorliegen. In 1/37 Fall liegen zusätzlich zu Chromosom 17 die Chromosomen 13 und 18 vermehrt vor - auch hier ist eine Aneuploidie des Genoms möglich. Dasselbe gilt für 1/37 Fall, bei dem die Chromosomen 18 und 21 zusätzlich zu Chromosom 17 vermehrt vorliegen.

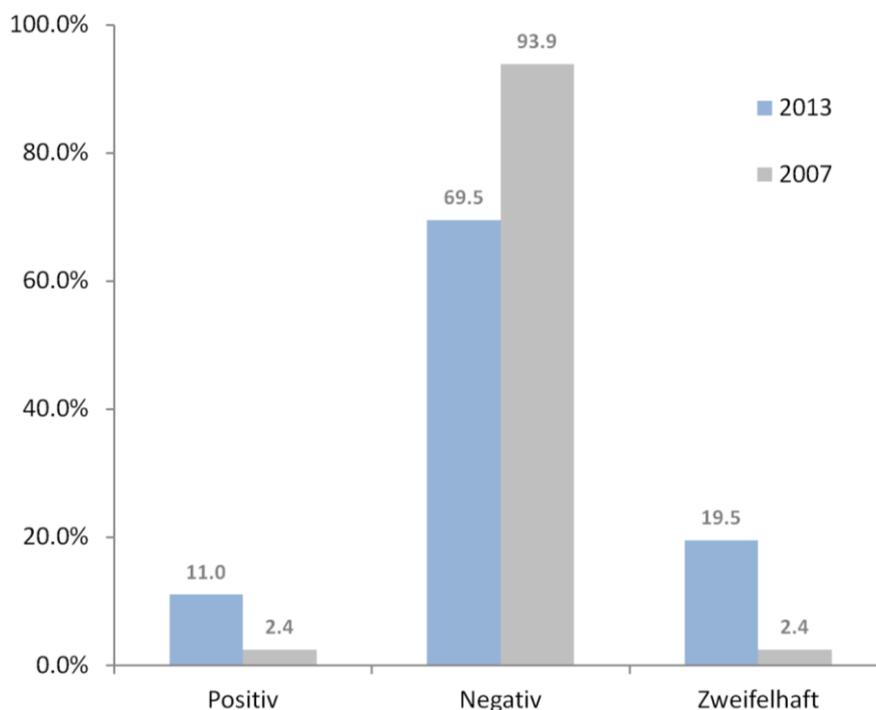
Unter 31/82 Fällen mit Zentromerzugewinn befindet sich ein Fall, in dem die Chromosomen 13, 18 und 21 vermehrt vorliegen, während Chromosom 17 aufgrund des fehlenden Zugewinns von D17S122, TP53 und RAI1 wahrscheinlich keine Polysomie aufweist.

2.2.11 Her2-Status von ASCO/CAP 2007/2013 im Vergleich

Mit dem Leitfaden von 2013 wurde die Ratio-Spanne von 1,8 - 2,2 für zweifelhafte Fälle abgeschafft und gleichzeitig der Schwellenwert für Her2-Positivität der Her2/Cen17 Ratio von 2,2 auf 2,0 herabgesetzt. 2007 war die Her2/Zellkern-Kopienzahl ausschließlich für die Interpretation von Ein-Marker ISH vorgesehen und somit kein etablierter Standard in der Zwei-Marker Routinediagnostik. Der in 2013 aktualisierte Leitfaden schreibt hingegen die Her2/Zellkern-Anzahl explizit auch für die Auslegung von Zwei-Marker ISH-Assays vor [67]. Da für die Einteilung der Kollektive die Zwei-Marker PathVysion-Sonde Her2/Cen17 - keine Ein-Marker Sonde - verwendet wurde, spart die Interpretation gemäß den ASCO/CAP-Richtlinien von 2007 die Her2/Nucleus-Anzahl aus.

Nachfolgend wird der Her2-Status des Her2-positiven und des potentiell polysomen Tumorkollektivs hinsichtlich Veränderungen mit der Aktualisierung der ASCO/CAP-Richtlinien betrachtet. Im benignen Gewebekollektiv und im nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten Tumorkollektiv sind alle Fälle sowohl unter 2007 ASCO/CAP-Empfehlungen als auch unter 2013 Her2-negativ. Eine Übersicht, die die genaue Umverteilung der einzelnen Fälle hinsichtlich des Leitfadens 2013 zeigt, findet sich im Anhang (siehe Abschnitt 3.6).

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV



2013 (blau):

Die Klassifikation "Her2-positiv" findet sich in 11,0% (9/82), "Her2-negativ" in 69,5% (57/82) und zweifelhaft in 19,5% (16/82) der Fälle.

2007 (grau):

Die Klassifikation "Her2-positiv" findet sich in 2,4% (2/82), "Her2-negativ" in 93,9% (77/82) und zweifelhaft in 2,4% (2/82) der Fälle.

Abbildung 29: Her2-Status für potentiell polysomes Tumorkollektiv (ASCO/CAP 2007/2013)

Durch die Modifikation der Richtlinien für die Ergebnisinterpretation lassen sich mehr Her2-positive Fälle im potentiell polysomen Tumorkollektiv beobachten: Das Her2-positive Kollektiv vergrößert sich im Vergleich zu 2007 um 7,3% (6/82). Weiterhin führt die Anwendung der aktualisierten Empfehlungen zur Verringerung der Fraktion von Her2-negativen Fällen um 24,4% (20/82). Auch eine deutliche Zunahme der zweifelhaften Fälle um 17,1% (14/82) ist unter den 2013-Empfehlungen zu beobachten.

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

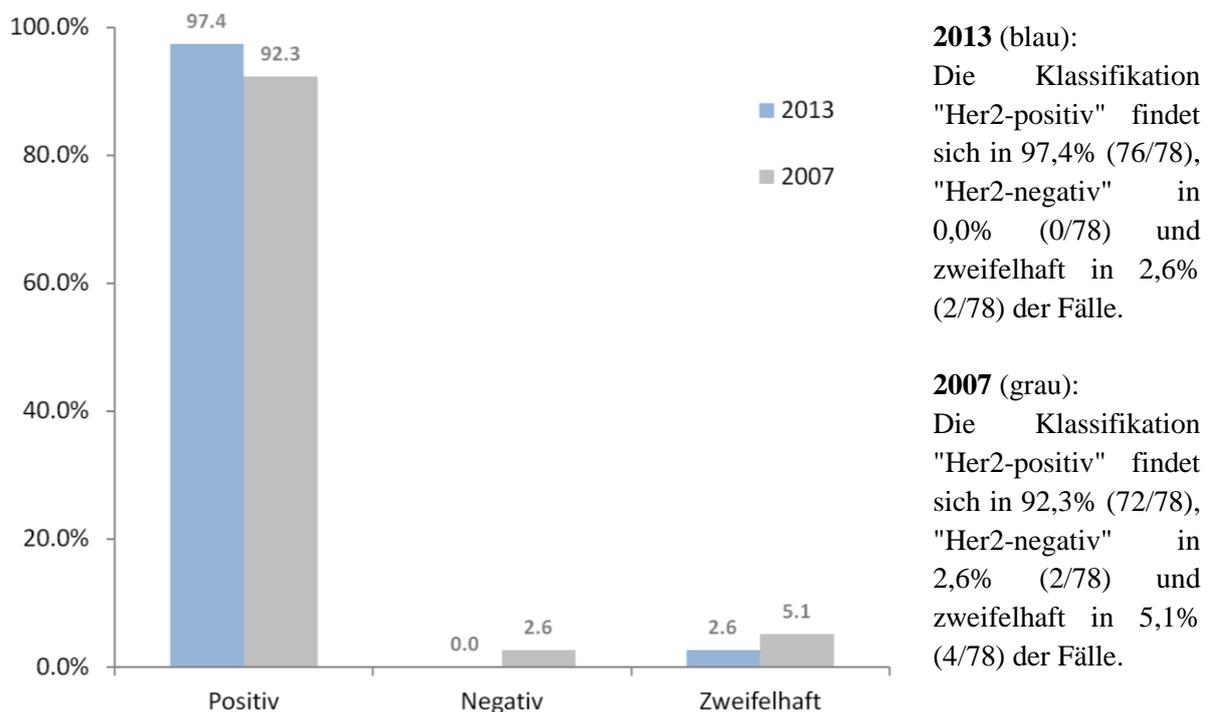


Abbildung 30: Her2-Status für Her2-positives Tumorkollektiv (ASCO/CAP 2007/2013)

Unter den ASCO/CAP-Richtlinien von 2013 wächst das positive Kollektiv um 9 Fälle an, während das negative Kollektiv um 7 Fälle abnimmt. Im Gegensatz zum polysomen Tumorkollektiv reduzieren sich unter den ASCO/CAP-Richtlinien von 2013 die zweifelhaften Fälle um 2,6% (2/78).

2.2.12 Her2-Status gemäß den 17p-Markern

Die aktuellen ASCO/CAP-Empfehlungen für den Marker Cen17 wurden jeweils identisch auf die 17p-Marker D17S122, RAI1 und TP53 angewandt, um Veränderungen des Her2-Status festzustellen. Dabei sind in dieser Studie ausschließlich im potentiell polysomen Tumorkollektiv und im Her2-positiven Tumorkollektiv Veränderungen des Her2-Status festzustellen. Alle Fälle des benignen Gewebekollektivs und des nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten Tumorkollektivs sind ohne Unterschied zwischen den einzelnen Markern Her2-negativ.

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

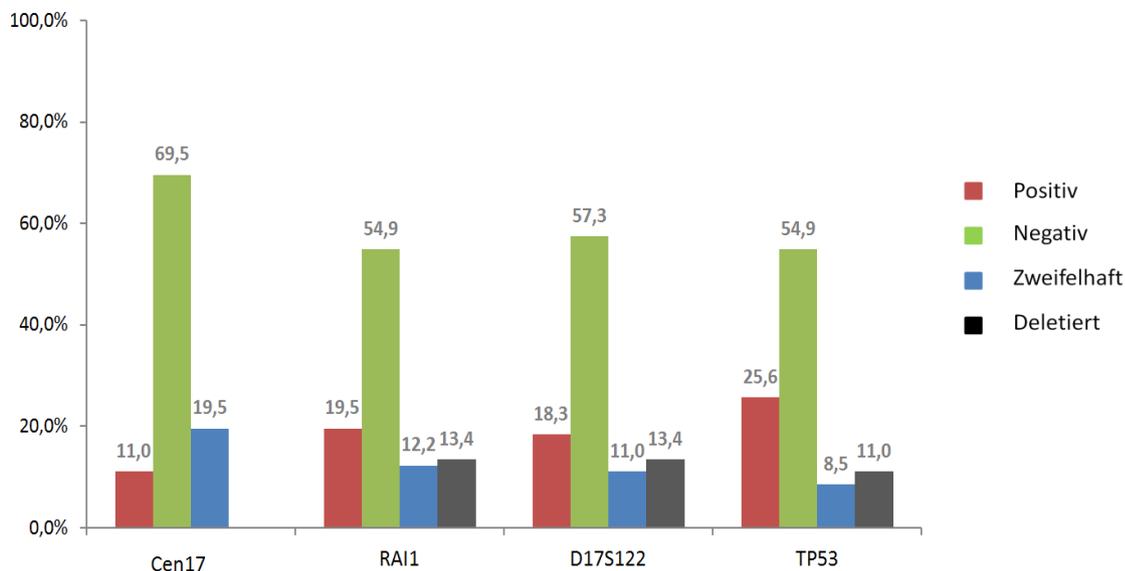


Abbildung 31: Her2-Status für potentiell polysomes Tumorkollektiv

Ein Her2-positives Ergebnis zeigen Cen17 in 11,0% (9/82), RAI1 in 19,5% (16/82), TP53 in 25,6% (21/82) und D17S122 in 18,3% (15/82). Ein Her2-negatives Ergebnis findet sich für den Marker Cen17 in 69,5% (57/82), für RAI1 in 54,9% (45/82), für TP53 in 54,9% (45/82) und für D17S122 in 57,3% (47/82). Zweifelhafte Ergebnisse werden in 19,5% (16/82) von Cen17 angezeigt, in 12,2% (10/82) von RAI1, in 8,5% (7/82) von TP53 und in 11,0% (9/82) von D17S122. TP53 liegt in 11,0% (9/82) deletiert vor und RAI1 und D17S122 in jeweils 13,4% (11/82).

Im Vergleich zeigt der Cen17-Marker die meisten Her2-negativen und zweifelhaften Fälle und die wenigsten Her2-positiven Fälle an. Die Her2-positiven Fälle vermehren sich unter allen drei 17p-Markern: von 11,0% (Cen17) auf 19,5% (RAI1), auf 18,3% (D17S122) oder auf 25,6% (TP53). Insgesamt reduzieren sich unter jedem der 17p-Marker die zweifelhaften Fälle. Dabei kommt es bei Anwendung der alternativen 17p-Marker nur dann zu einem

zweifelhaften Ergebnis, wenn auch die Her2/Cen17 Ratio zuvor zweifelhaft war. Es entstehen somit keine zusätzlichen zweifelhaften Fälle. Von den zweifelhaften Fällen stuft RAI1 5/16 (31,3%), D17S122 6/16 (37,5%) und TP53 9/16 (56,3%) positiv ein. Keiner der zuvor zweifelhaften Fälle wird unter einem 17p-Marker negativ. Der TP53-Marker führt in der Klassifizierung von Her2-positiven Fällen und reduziert die zweifelhaften Fälle um mehr als die Hälfte. Die Fraktion der Her2-negativen Fälle verkleinert sich von 69,5% (Cen17) auf 54,9% (RAI1 und TP53) oder 57,3% (D17S122). Von den zuvor Her2-negativen Fällen stuft die Her2/RAI1 Ratio 17,5% (10/57), die Her2/D17S122 Ratio 12,3% (7/57) und die Her2/TP53 Ratio 21,1% (12/57) als positiv ein.

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

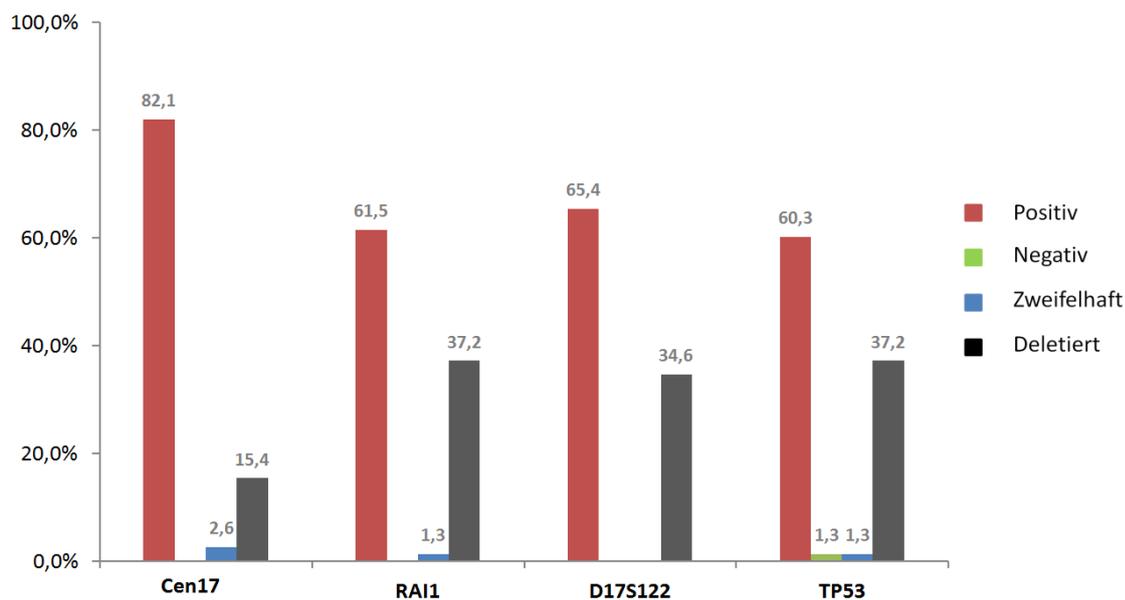


Abbildung 32: Her2-Status für Her2-positives Tumorkollektiv

Ein Her2-positives Ergebnis zeigen Cen17 in 82,1% (64/78), RAI1 in 61,5% (48/78), TP53 in 65,4% (47/78) und D17S122 in 60,3% (51/78). Ein Her2-negatives Ergebnis findet sich nur für den Marker TP53 in 1,3% (1/78). Zweifelhafte Ergebnisse werden in 2,6% (2/78) von Cen17 angezeigt und von RAI1 und TP53 in jeweils 1,3% (1/78). TP53 und RAI1 liegen in jeweils 37,2% (29/78) deletiert vor, D17S122 in 34,6% (27/78) und Cen17 in 15,4% (12/78).

Interessant sind die beiden unter Cen17 zweifelhaften Fälle: Einer davon wird über D17S122 als positiv eingestuft, über die Marker TP53 und RAI bleibt er zweifelhaft. Im anderen liegen alle 17p-Marker deletiert vor. Folglich findet im Her2-positiven Kollektiv eine Reduzierung der zweifelhaften Fälle um 1,2% (1/78) statt. Die Reduktion ist sehr gering, da im Her2-positiven Kollektiv ohnehin nur zwei zweifelhafte Fälle vorkommen.

2.3 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Berechtigung des Cen17-Markers in einer Zwei-Marker Hybridisierungssonde (Zentromer 17) als Referenzregion für die Häufigkeit von Chromosom 17 überprüft. Dabei wurden 17p-Hybridisierungsmarker als mögliche Alternative für eine akkuratere Her2-Diagnostik evaluiert.

Die drei untersuchten Marker RAI1, TP53 und D17S122 liegen auf dem kurzen Arm 17p von Chromosom 17. Hier wurde untersucht, ob sich mithilfe dieser Marker möglichst zuverlässig eine "echte" von einer "falschen" Polysomie 17 (im Sinne einer fokalen Cen17-(Ko-)Amplifikation abgrenzen lässt. Ferner soll mithilfe der 17p-Marker die Subgruppe der zweifelhaften Fälle ("equivocals"), bei denen kein Hinweis für eine Therapieentscheidung gegeben ist, gering gehalten und möglichst in Her2-positive bzw. -negative Fälle differenziert werden.

Dafür wurden neben der in der ISH-Routinediagnostik etablierten PathVysion-Sonde (Cen17/Her2) zwei triple-kolorierte Sonden (TP53/Cen17/Her2 und RAI/Cen17/Her2) und eine Zwei-Marker Sonde (D17S122/Her2) auf folgende Kollektive angewendet:

- 82 potentiell polysome Tumoren mit einem Cen17-Zugewinn ($\text{Cen17} > 2,24$)
- 52 Tumoren mit einer normal-diploiden Cen17-Anzahl ($\text{Cen17} < 2,24$)
- 78 Tumoren mit einer Her2-Amplifikation ($\text{Her2/Cen17} \geq 2,0$)
- 20 Gewebeproben aus Brustgewebsreduktionen gesunder Frauen als benigner Standard (Kontrollgewebe)

2.3.1 Cen17-Amplifikation als häufige Ursache "polysomer" Tumoren

Eine signifikante Anzahl von Tumoren mit erhöhter Cen17-Anzahl ist nicht zwangsläufig auf eine Multiplikation des gesamten Chromosom 17 zurückzuführen, sondern spiegelt häufig lediglich eine partielle Amplifikation der Zentromer 17-Region Cen17 wider: 37,8% (31/82) des potentiell polysomen Kollektivs zeigen Zugewinne von ausschließlich Her2 und Cen17. In den 31 mit Zentromerzugewinn liegen die alternativen 17p-Marker RAI1, TP53 und D17S122 nicht vermehrt, eventuell aber deletiert vor. Werden davon Tumoren mit deletierten 17p-Signalen ausgeschlossen, bleiben 15/82 (18,3%) Tumoren mit erhöhter Her2- und Cen17-Anzahl übrig, in denen alle 17p-Marker gleichzeitig in normaler Anzahl (circa zwei Signale pro Zellkern) vorhanden sind.

Diese 15 Fälle sind diagnostisch besonders interessant, da die erhöhte Cen17-Zahl fälschlicherweise eine Polysomie 17 suggeriert und der therapeutisch relevante Wert der Her2/Cen17 Ratio erniedrigt ist. Werden die Ratios der 17p-Marker hinzugezogen, werden 46,7% (7/15) dieser Fälle, welche zuvor wegen der erniedrigten Her2/Cen17 Ratio als Her2-negativ bzw. zweifelhaft klassifiziert wurden, als Her2-positiv eingestuft. Dies legt nahe, dass die Abgrenzung "echter" Polysomie 17 von einer Cen17-Amplifikation ausschlaggebend für die Therapieentscheidung ist - andernfalls wird Patientinnen eine erfolgversprechende, möglicherweise wirksame anti-Her2 Therapie (z. B. mit Trastuzumab) aufgrund einer insuffizienten Diagnostik vorenthalten.

Auch im Her2-positiven Tumorkollektiv wird die häufige Koamplifikation von Her2 und Cen17 deutlich: 51,3% (40/78) aller Her2-amplifizierten Tumoren zeigen eine erhöhte Cen17-Anzahl, wohingegen nur 14,1% - 16,7% dieser Tumoren vermehrte Signale der drei alternativen 17p-Marker aufweisen. Somit liegen nur 48,7% (38/78) der Her2-amplifizierten Fälle ohne gleichzeitige Cen17-Koamplifikation vor.

Zudem wird eine deutliche Abnahme der Amplifikationshäufigkeit mit zunehmender Entfernung des Markers von der Zentromer 17-Region im potentiell polysomen Tumorkollektiv manifest: RAI1 (61,0%) > D17S122 (54,9%) > TP53 (46,3%). Dies impliziert, dass die Expansion einer regional-perizentrischen Amplifikation nicht notwendigerweise das ganze Chromosom 17 betrifft, sondern in Richtung der telomerischen Region von 17p abnimmt. Mit zunehmender Distanz zur perizentrischen Region wird es unwahrscheinlicher, dass RAI1, D17S122 und TP53 gemeinsam mit Her2 vermehrt vorliegen. Bei Varga et al. wurde neben der reduzierten Amplifikationshäufigkeit in Richtung 17p zusätzlich eine Abnahme der Alterationswahrscheinlichkeit in Richtung 17q deutlich. Bei 14 Brusttumoren mit Her2/Cen17-Koamplifikation verzeichneten die vier zusätzlichen Marker Amplifikationen mit folgenden Häufigkeiten: RARA ("retinoic acid receptor", 17q): 71,4% (10/14) > TOP2A (17q)/D17S122 (17p): 21,4% (3/14) > TP53 (17p): 0% (0/14) (siehe Abschnitt 3.7) [9].

Die hohe Anfälligkeit der perizentrischen Region für abnorme Kopienzahlen wird deutlich. Studien, in denen polysom geglaubte Fälle tatsächlich eine fokale Amplifikation von Cen17 aufwiesen, sind zahlreich [8],[26],[57],[58],[95]: Bei Tse et al. zeigte Cen17 in mehr als 80% (147/171) fälschlicherweise eine Polysomie 17 an. In 5,3% (9/171) lag ausschließlich eine Cen17-Amplifikation ohne Her2-Amplifikation vor, was nahelegt, dass Cen17 - identisch wie Her2 - gesondert Amplifikationen zeigen kann [55]. Jang et al. führten 57,6% (140/243) von

potentiell polysomen Fällen auf eine alleinige Her2/Cen17-Koamplifikation zurück - sie sprachen in diesem Kontext von einem "Amplikon", das die beiden Gene Her2 und Cen17 überspannt [10]. Dass nahe benachbarte Regionen zur Bildung eines Amplikons neigen, wird nicht nur für Her2 und Cen17, sondern auch für Her2 und TOP2A beschrieben [96]. Auch für GRB7, das 10 kb entfernt vom Her2-Genlocus liegt [97], wird eine häufige Koamplifikation mit Her2 beschrieben [98],[99]. Erwähnenswert dabei ist, dass es einen direkten funktionellen Zusammenhang zwischen Her2 und GRB7 gibt: Mit seiner SH2-Domäne bindet GRB7 an Her2, verstärkt dessen Phosphorylierung und verbindet Her2 mit Akt. Vermehrte Her2- und Akt-Phosphorylierungen stimulieren das Tumorwachstum. Damit dient GRB7 als zytoplasmatischer Aktivator und Adaptor für Her2 und moduliert als Kontext-abhängiges Onkogen die Signaltransduktion dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Dabei zeigt GRB7 allein keine transformierende Aktivität, sondern nur kooperativ und in gemeinsamer Überexpression mit Her2 [97].

Auch die aCGH-Analyse der vorliegenden Studie unterstreicht, dass erhöhte Her2- und Cen17-Signale aufgrund unmittelbarer Nachbarschaft häufig Koamplifikationen aufweisen. In Einklang mit einer vergleichenden FISH- und aCGH-Untersuchung von Marchio et al. zeigen die aCGH-Daten zudem, dass die Cen17-Region eher dem langen als dem kurzen Arm von Chromosom 17 zugehört [7]. Die Cen17-Zahl als Repräsentant für das gesamte Chromosom 17 und Indikator einer "echten" Polysomie 17 ist offensichtlich nicht tragbar [55]. Vor diesem Hintergrund wäre es sinnvoll, zytogenetisch mittels FISH untersuchte Tumoren, die vermehrte ($> 2,0$) Cen17-Hybridisierungssignale zeigen, nicht grundsätzlich als „polysom“ zu bezeichnen, sondern von Tumorgewebe mit erhöhter Zentromer 17-Kopienzahl („tumors with increased cen17 copy numbers“) zu sprechen. Mit dieser Nomenklatur wird nicht ausgeschlossen, dass eine Polysomie 17 vorliegen könnte, aber es wird eben nicht zwangsläufig davon ausgegangen, dass sie besteht.

2.3.2 Eine "echte" Polysomie 17 als ein seltenes Ereignis

Alle von FISH als potentiell polysom eingestuften Tumoren weisen in der aCGH tatsächlich erhöhte Anzahlen von Her2- und Cen17-Hybridisierungssignalen auf, wobei FISH-Zählwerte und aCGH-Daten konkordant sind.

Innerhalb des potentiell polysomen Kollektivs zeigen nahezu 100% aller 82 Tumorgewebe eine erhöhte Anzahl von Her2, was sowohl durch eine "echte" Polysomie 17 als auch durch eine fokale Her2/Cen17-Koamplifikation bedingt sein kann. Jedoch ist die Häufigkeit von

Gewebe, die gleichzeitig erhöhte Markersignale auf 17p (D17S122, RAI1, TP53) zeigen, signifikant niedriger als 100%. Dies impliziert, dass eine beträchtliche Anzahl der Tumoren mit erhöhter Cen17-Anzahl nicht auf eine "echte" Polysomie, sondern auf eine Koamplifikation mit Her2 zurückzuführen ist. So würde eine "echte" Polysomie die Multiplikation des gesamten Chromosom 17 mit einem äquivalenten Zugewinn aller Marker bedeuten. Ein Zuwachs aller fünf Marker (Her2, Cen17, RAI1, TP53, D17S122) findet sich in nur 45,1% (37/82) der potentiell polysomen Tumoren. Dabei scheinen selbst diese 37 Fälle eine heterogene Gruppe darzustellen: Lediglich 11 der 37 Fälle zeigen identische Zugewinne aller fünf Marker (Signalunterschiede $\leq 0,5$). Eine "echte" Polysomie 17 ist also nur in 13,4% (11/82) der 82 potentiell polysomen Tumoren aufgrund homogener Zugewinne aller fünf Marker wahrscheinlich. Im Her2-positiven Tumorkollektiv findet sich ein äquivalenter Zuwachs aller fünf Hybridisierungsmarker in 3,8% (3/78).

Diese Ergebnisse stimmen überein mit Untersuchungen zahlreicher Autoren, die "echte" Polysomie 17 als seltenes Ereignis beschreiben [7],[9],[41],[39],[52],[100]: Tse et al. identifizierten unter 171 Brusttumoren mit apparenter Polysomie 17 (Cen17 > 2,6) nur 24 Fälle (14%) mit äquivalentem Zugewinn der verwendeten Marker Cen17, Her2, RAI1, RARA und TP53 (siehe Abschnitt 3.7). Identisch zur vorliegenden Untersuchung verwendeten Tse et al. Genloci sowohl auf 17p (RAI1, TP53) als auch auf 17q (RARA, Her2, Cen17) [55]. Eine noch niedrigere Präsenz "echter" Polysomie 17 schlagen Jang et al. vor: Unter 243 Fällen mit einem Cen17-Zugewinn (Cen17 > 2,6) fand sich nur in 2 Fällen (0,8%) ein simultaner Zuwachs der fünf Marker TP53, RAI1, Her2, RARA und Cen17 (siehe Abschnitt 3.7) [10]. Dass Polysomie 17 mit einer Häufigkeit von weniger als 1% vorkommt, unterstützt eine weitere zytogenetische Untersuchung von mehr als 5000 invasiven Mammakarzinomen: Lediglich in 0,48% (24/5020) wurde Polysomie 17, basierend auf einem Zuwachs der sechs Marker TP53, RAI1, Cen17, Her2, RARA und TOP2A, gefunden [101]. In einer MLPA-Analyse von Moelans et al. wurde unter 111 Tumoren kein einziger Fall mit einer Polysomie 17 identifiziert, obwohl 19% der Fälle zuvor in ISH-Untersuchungen eine vergrößerte Cen17-Zahl aufwiesen [8]. Auch die molekulare Karyotypisierungsstudie von Marchio et al. unterstreicht die Rarität von Polysomie 17: Unter 18 polysomen Tumoren (Cen17 $\geq 3,0$) zeigte sich in der aCGH nur 1 Fall (5,5%) mit Polysomie 17. Die restlichen Fälle wiesen Zugewinne auf 17q mit (n = 11) und ohne (n = 1) involvierte perizentrische oder eine alleinige fokale Cen17-Amplifikation (n = 5) auf [7]. Eine "echte" Polysomie 17 scheint somit ein Ereignis zu sein, das bei weitem nicht so häufig auftritt, wie es die vielfach erhöhte Cen17-Anzahl suggeriert.

Ob "echte" Polysomie 17 tatsächlich als Multiplikation des gesamten Chromosom 17 eine entsprechend direkt proportionale Vermehrung aller Chromosom 17-Marker impliziert, bedarf weiterer Klärung. Möglicherweise besteht gar keine homogene Vermehrung aller Chromosom 17-Marker, wie es eine Polysomie per definitionem vorgibt. Zwar mag es durchaus "echte" Polysomien geben, jedoch treten diese wahrscheinlich häufig im Kontext chromosomaler Instabilität (CIN) auf und gehen mit weiteren chromosomalen Aberrationen/Alterationen wie z. B. Deletionen einher. Petroni et al. schlagen daher vor, anstelle von Polysomie 17 von *disorder*, also sinngemäß von chromosomaler Alteration bzw. Abweichung vom Normalgewebe, zu sprechen [85].

Mithilfe der Triple-Sonde Spec13/Cen18/Spec21 wurde in dieser Arbeit die Anzahl weiterer chromosomaler Zentromermarker evaluiert: Es fällt auf, dass im potentiell polysomen Tumorkollektiv die Chromosomen 13, 21 und 18 insgesamt in höherer Anzahl als im nicht-polysomen Tumorkollektiv vorliegen. Obgleich diese drei zusätzlichen Zentromermarker nicht den gesamten Chromosomensatz repräsentieren, kann vorsichtig vermutet werden, dass in solchen Fällen eine Polyploidisierung stattgefunden hat, die mehrere Chromosomen betrifft:

In 2 der 37/82 "echt" polysomen Fälle des potentiell polysomen Kollektivs sind neben Chromosom 17 die Chromosomen 13, 18 und 21 gleichzeitig vermehrt. Möglicherweise ist "echte" Polysomie 17 Konsequenz einer Aneuploidie des gesamten Tumors. Für das Verständnis der Entstehungsmechanismen und Begleitumstände "echter" Polysomie 17 können Untersuchungen, die neben Alterationen von Chromosom 17 das übrige Genom betrachten, dabei helfen, "echte" und scheinbare Polysomien, die auf einer regionalen Amplifikation beruhen, zu differenzieren.

2.3.3 Evaluation der drei untersuchten 17p-Marker

Die TP53-Genregion liegt bei Brustkrebs häufig mutiert vor, sie zeigt jedoch selten vermehrte Kopien oder Amplifikationen [10],[101],[102]. Mit seiner Position 17p13.1 ist es relativ weit entfernt vom Her2-Genlocus, was die Bildung eines Amplikons mit Her2 unwahrscheinlich macht. TP53 zeigt im potentiell polysomen Tumorkollektiv - verglichen mit D17S122 und RAI1 - die wenigsten Zugewinne und Verluste. Dies mag auch dadurch bedingt sein, dass für TP53 der größte Referenzbereich gewählt wurde, da selbst im benignen Gewebe Abweichungen von der normal-diploiden Signalzahl zu verzeichnen waren. Als beinahe äußerster Bestandteil der telomerischen Region des kurzen Arms von Chromosom 17, der

vielfach in genetische Verluste involviert ist [103], liegt TP53 häufig deletiert vor: TP53 weist im nicht-polysomen Tumorkollektiv mit 25% (13/52) - verglichen mit den anderen 17p-Markern - die meisten Verluste auf. Aufgrund der Anfälligkeit für Deletionen ist ein Heranziehen von TP53 als verlässliches Surrogat für die Häufigkeit von Chromosom 17 kritisch. Dennoch empfehlen Varga et al. TP53 als adäquates Bezugsgen: In 14 Her2/Cen17-koamplifizierten Fällen lag TP53 unter vier weiteren 17p- und 17q-Markern als einziger Marker nicht amplifiziert vor. Gerade in potentiell polysomen Fällen erleichtert TP53 laut Varga et al. die Detektion "echter" Polysomie und deckt eine kaschierte Her2-Amplifikation auf [9].

RAI1 bzw. SMS war ein weiterer alternativer Marker der vorliegenden Untersuchung und ist auf 17p11.2 lokalisiert. Deletionen dieses Gens sind in viele kongenitale Anomalien involviert [104]. Studien bezüglich dieses Genlocus in Verbindung mit Brusttumoren sind rar und abnorme Anzahlen von Genkopien weitgehend unbekannt [10]. Im potentiell polysomen Kollektiv zeigt RAI1 im Vergleich zu den beiden anderen 17p-Markern die meisten Amplifikationen.

Im Gegensatz dazu fanden Jang et al. RAI1-Zugewinne auf Grundlage von aCGH-Daten des TCGA-Datensets in nur 0,7% der Brusttumoren und eine Her2-Koamplifikation in nur 0,1% der Her2-amplifizierten Tumoren. Verluste von RAI1 waren jedoch sowohl in der Datenbank als auch in den ISH-Untersuchungen häufig zu verzeichnen. Somit kann der Gebrauch von RAI1 als Referenzgen laut Jang et al. zu einer Überschätzung des Her2-Status führen [10]. Marchio et al. kritisieren außerdem die geringe Entfernung von RAI1 zu Cen17: Perizentrische Amplifikationen, die häufig in Her2-amplifizierten Brusttumoren auftreten, könnten die RAI1-Region miteinschließen [7].

Die Datenlage zu Amplifikationshäufigkeiten in Mammatumoren für den dritten 17p-Marker D17S122, der auf 17p12 lokalisiert ist, ist gering. Im potentiell polysomen Tumorkollektiv zeigt D17S122 Kopienzahlveränderungen, die zwischen denjenigen von TP53 und RAI1 liegen. Bei Varga et al. wies D17S122 unter 14 Her2/Cen17-koamplifizierten Tumoren nur in 21,4% (3/14) Amplifikationen auf. Koudelakova et al. sehen dennoch die unmittelbare Nähe von 17p12 zum häufig deletierten TP53 als fragwürdig an: Deletionen, die 17p13.1 (TP53) betreffen, könnten auf 17p12 übergreifen und die Kopienzahl von D17S122 beeinflussen [101].

Nachteil aller 17p-Marker ist das vielfach beschriebene Phänomen, dass Mammakarzinome häufig einen relativen oder partiellen Verlust des kurzen Arms zeigen [8],[13],[14]. Während in der aCGH-Analyse der vorliegenden Untersuchung Marker des langen Arms 17q vermehrt Zugewinne aufweisen, zeichnet sich ein vergleichsweise niedriger Level der 17p-DNA ab. Auch die erhobenen FISH-Daten lassen einen relativen Verlust der 17p-Marker erkennen: RAI1, D17S122 und TP53 liegen in 11,0% - 13,4% der potentiell polysomen Tumoren, in 34,6% - 37,2% der Her2-amplifizierten Tumoren und in 15,4% - 25,0% der nicht-polysomen Tumoren deletiert vor. Die diagnostische Signifikanz alternativer 17p-Marker ist somit aufgrund häufiger Deletionen niedrig oder zumindest ungenau. Ein Hinzuziehen eines dieser drei Marker kann zu falschen Interpretationen führen, genauso wie die alleinige Betrachtung von Cen17. Diese Tatsache legt nahe, dass die Darstellung eines einzelnen 17p-Markers keine reliable Aussage zur Häufigkeit von Chromosom 17 ermöglicht, zumindest dann nicht, wenn Verluste zu verzeichnen sind. Eine Verwertbarkeit könnte dann nur noch in Kombination mit anderen Marker gegeben sein.

Ob überhaupt ein einzelner Chromosom 17-Marker existiert, der eine "echte" Polysomie 17 sicher detektiert, ist fragwürdig. Auf der Suche nach beständigen Genloci auf Chromosom 17 fanden Jang et al. unter 1377 analysierten Genen in insgesamt 1018 Brusttumoren 11 Gene mit stabilen Kopienzahlen (siehe Abschnitt 3.7), die alle nah an der perizentrischen Region (17q11.1-17q11.2) lagen. In der TCGA-Datenbank zeigten jedoch lediglich 50% der Brusttumoren eine Diploidie dieser ausgewählten Regionen und 25% wiesen Deletionen der 11 Genloci auf [10]. Diese Daten lassen erkennen, dass die Existenz eines einzigen stabilen Markers unwahrscheinlich ist. Werden mehrere Marker gleichzeitig betrachtet, vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest eines der Gene diploid vorliegt.

Aus diesem Grund empfiehlt die vorliegende Studie - übereinstimmend mit Tse et al., die die Nützlichkeit mehrerer Chromosom 17-Marker bereits dargelegt haben [55], - die Anwendung eines "Marker-Kombinations-Score": Die kombinierte Interpretation von 17p- und 17q-Markern stellt eine plausible Rationale dar, die mit größerer Genauigkeit als bisher die "echte" Häufigkeit von Chromosom 17 reflektieren könnte. Auch wenn die Zentromer-Region durch die hier angewandte aCGH nicht abgedeckt wurde, scheint es evident, dass Cen17-Hybridisierungsmarker im FISH-Ansatz eine chromosomale Region erfassen, die eher die Häufigkeit des langen als des kurzen Arms widerspiegelt. Folglich wurde in dieser Arbeit Cen17 als 17q-Marker angesehen, der in der Auswertung mit Markersignalen von RAI1, TP53 oder D17S122 (alle auf 17p) kombiniert werden kann. Die Tatsache, dass in

Mammakarzinomen 17q tendenziell eher Zugewinne zeigt und 17p Verluste, unterstreicht, dass der Mittelwert aus beiden ein adäquater Referenzwert für die Anzahl von Chromosom 17 sein könnte. Mithilfe des "Marker-Kombinations-Score" würden sich unter der Verwendung von Triple-Sonden, die neben Her2 einen 17p- und 17q-Marker einschließen, Verluste des kurzen und Zugewinne des langen Arms rechnerisch gegenseitig ausgleichen. Die kombinierte Betrachtung von mindestens zwei Hybridisierungsmarkern stellt somit einen adäquateren Bezugswert für die Häufigkeit von Chromosom 17 dar, erleichtert die Detektion einer potentiellen Polysomie und erlaubt eine zuverlässigere Aussage über eine mögliche Her2-Amplifikation [10]. Außerdem wird durch die Anwendung des "Marker-Kombinations-Score" die Kohorte der zweifelhaften Fälle um 12,5% innerhalb des potentiell polysomen Kollektivs verkleinert und stellt damit eine Methode zur Reduktion dieser therapeutisch-strittigen Fälle dar. Inwieweit die neu differenzierten Fälle, die mit dem "Marker-Kombinations-Score" nun entweder „Her2-negativ“ oder „-positiv“ klassifiziert werden, auch aus klinischer Sicht sinnvoll stratifiziert sind, müsste prospektiv beobachtet werden. So müsste beispielsweise systematisch untersucht werden, ob neu differenzierte Her2-positive Tumorpatientinnen tatsächlich von einer anti-Her2 Behandlung profitieren.

2.3.4 Klassifizierungsveränderungen des Her2-Status

Um ein global einheitliches Procedere für IHC und zytogenetische Her2-Testung zu etablieren, wurden von der ASCO/CAP im Jahr 2007 Richtlinien für die Ergebnisinterpretation des Her2-Status publiziert und 2013 aktualisiert [18],[66]:

Eine der Hauptmodifikationen war die Reduktion der Her2/Cen17 Ratio von 2,2 auf 2,0 als Schwellenwert für Her2-Positivität. Während die Her2-Genkopienzahl pro Zellkern als weiteres Kriterium für Her2-Positivität ($\text{Her2/Nucleus} > 6,0$) unverändert blieb, schaffte der Leitfaden von 2013 die Ratio-Spanne von 1,8 - 2,2 für zweifelhafte Fälle ab. 2007 war die Her2/Zellkern-Kopienzahl nur für die Interpretation von Ein-Marker ISH vorgesehen und kein etablierter Standard in der Zwei-Marker Routinediagnostik. Die Richtlinien von 2013 hingegen schreiben die Her2/Zellkern-Anzahl explizit für die Auslegung von Zwei-Marker ISH-Assays vor [67]. Damit berücksichtigt der Leitfaden von 2013 die Tatsache, dass erhöhte Cen17-Anzahlen die Her2-Klassifizierung beeinflussen können: Um falsch-negative Ergebnisse durch eine erhöhte Cen17-Anzahl zu vermeiden, wurde die singuläre Betrachtung von Her2 als alleiniges Positivitätskriterium für Zwei-Marker Sonden eingeführt [10].

Im Vergleich zu 2007 vergrößert sich im potentiell polysomen Tumorkollektiv unter Verwendung des Standard-Referenzmarkers Cen17 die Anzahl der Her2-positiven Fälle um 7,3% (6/82) und der zweifelhaften Fälle um 17,1% (14/82), die Her2-negativen Fälle reduzieren sich um 24,4% (20/82). Durch den Zuwachs an Her2-positiven Fällen können potentiell mehr Patienten von einer anti-Her2 Therapie profitieren. Andererseits zeigt sich - auch in weitaus größeren Brustkrebskohorten - eine signifikant höhere Anzahl Her2-negativer Fälle, die unter den Richtlinien von 2013 als zweifelhaft klassifiziert werden [20],[68],[64],[105],[106]. Diese Modifikationen erhöhen so eher die Sensitivität als die Spezifität von zytogenetischem Her2-Testen [67],[105]. Auch Stoss et al. stellten bei der Evaluation von 6018 Brusttumoren eine ähnliche Tendenz des Her2-Status fest: 2013 wurden 3380 (56,2%) als Her2-positiv eingestuft, 2007 nur 3339 (55,5%). Die Zahl der zweifelhaften Fälle vergrößerte sich von 44 (0,7%) auf 113 (1,9%), die Her2-negativen Fälle nahmen um rund 100 (1,6%) Fälle ab. Die alleinige Verwendung der Her2-Genkopienzahl führt also zu einem signifikanten Zuwachs an zweifelhaften Fällen [65]. Als Folge der aktualisierten ASCO/CAP-Richtlinien fanden Fan et al. eine veränderte Klassifizierung von insgesamt 21% der Brusttumoren: Mehr als 15% der 2007 als Her2-negativ eingestuften Tumoren werden nun als zweifelhaft klassifiziert [42]. Die Kategorisierung neuer zweifelhafter Fälle ("the new equivocal") ist problematisch, da diese Klassifizierung nichtssagend für die therapeutische Vorgehensweise ist.

Auffällig ist, dass im Vergleich zu 2007 die nach den Richtlinien von 2013 kategorisierten zweifelhaften Fälle eine beträchtlich höhere Anzahl an Tumoren mit erhöhter Cen17-Zahl einschließen [42],[68]. Long et al. berichteten von 17/35 Her2-negativen Fällen in 2007, die 2013 als zweifelhaft eingestuft wurden und gleichzeitig drei bzw. vier Cen17-Signale aufwiesen [67]. Zudem zeichnet sich ein Trend zu höherem Grading und höherem Ki67 bei den neuen zweifelhaften Fällen ab, was sich in der bisher größten Studie zu IHC 2+ zweifelhaften Fällen (n = 957) von Sapino et al. zeigte [64]. Die singuläre Betrachtung der Her2/Zellkern-Genkopienzahl scheint dazu zu führen, dass immer mehr polysome oder zumindest Tumoren mit Cen17-Zugewinn als zweifelhaft klassifiziert werden. Unter den vielen neuen zweifelhaften Fällen befinden sich also zahlreiche Tumoren mit Polysomie 17 bzw. fokaler Cen17-Amplifikation. Es ist wichtig, die Biologie der Tumoren mit erhöhter Cen17-Zahl zu verstehen, um das Ansprechen auf eine anti-Her2 Behandlung einschätzen und diagnostisch eine entsprechende Stratifizierung vornehmen zu können, die das Kollektiv der zweifelhaften Fälle verkleinert.

Wird der Leitfaden von 2013 nicht nur auf den Standardmarker Cen17, sondern jeweils auch auf die drei 17p-Marker D17S122, RAI1 und TP53 ausgelegt, so zeigt Cen17 im Vergleich die meisten Her2-negativen, die meisten zweifelhaften und die wenigsten Her2-positiven Fälle im potentiell polysomen Tumorkollektiv. Werden dagegen die Ratios der alternativen 17p-Hybridisierungsmarker betrachtet, reduzieren sich nicht nur die Kollektive der Her2-negativen, sondern auch der zweifelhaften Fälle, während die Zahl der Her2-positiven Tumoren ansteigt: 19,5% (16/82) des potentiell polysomen Tumorkollektivs werden von Cen17 als zweifelhaft eingestuft, wovon die 17p-Marker 31,3% - 56,3% als Her2-positiv klassifizieren. Dies reduziert die zweifelhaften Fälle um mehr als die Hälfte. Dabei werden auf Basis der 17p-Marker ausschließlich Fälle als zweifelhaft eingestuft, die ohnehin von der Her2/Cen17 Ratio als zweifelhaft klassifiziert werden - es werden damit also keine zusätzlichen zweifelhaften Fälle generiert. Die Verwendung des TP53-Markers führt zu den meisten Her2-positiven und gleichzeitig zu den wenigsten zweifelhaften Fällen. Auch Tse et al. berichteten, dass beinahe die Hälfte der zweifelhaften Fälle mit erhöhter Cen17-Anzahl von Her2-negativ auf Her2-positiv mithilfe zusätzlicher Chromosom 17-Marker reklassifiziert wurde [10]. Dennoch besteht laut Jang et al. bei Hinzuziehen zusätzlicher 17p-Marker das Risiko, dass aufgrund häufiger Deletionen von 17p-Markern zu viele Fälle als Her2-positiv klassifiziert werden. Dies führt zu einem Zuwachs falsch-positiver Ergebnisse. So fanden Jang et al. bei Her2-negativen Fällen, die durch alternative Referenzgene als Her2-positiv eingestuft wurden, eine zunehmende Diskordanz ($> 30\%$) zwischen FISH- und IHC-Ergebnissen. Außerdem war keine Übereinstimmung mit zugehörigen histologisch-pathologischen Ergebnissen festzustellen [10]. In der vorliegenden Dissertation jedoch wurden ausschließlich alternative Marker-Ratios hinzugezogen, wenn die zugehörigen 17p-Marker nicht deletiert, sondern diploid vorlagen. Die Kritik von Jang et al. an der Überschätzung des Her2-Status, bedingt durch fälschlicherweise erhöhte Marker-Ratios, trifft also auf die hier durchgeführte Untersuchung nicht zu.

Besonders interessant sind fünf der 16 unter Verwendung von Cen17 als zweifelhaft bezeichneten Fälle, da bei diesen eine fokale Cen17-Amplifikation sehr wahrscheinlich ist. Im Gegensatz zu den Her2/Cen17 Ratiowerten, die einen zweifelhaften Befund darstellen, werden die fünf Fälle bei Anwendung der alternativen 17p-Marker-Ratios alle als Her2-positiv eingestuft. Wichtig festzuhalten ist, dass die 17p-Marker nur dann hinzugezogen wurden, wenn keine Deletionen vorlagen.

Aufgrund der Tatsache, dass ein Großteil der zweifelhaften Fälle von sog. polysomen Fällen konstituiert wird, ist eine Differenzierung zwischen "echter" und "falscher" Polysomie 17 letztlich ausschlaggebend für eine korrekte Bestimmung des Her2-Status und ermöglicht eine Reduzierung zweifelhafter Fälle, was zu einer verbesserten Stratifizierung von Brustkrebspatientinnen führen könnte. Mit den Richtlinien von 2013 wird ausdrücklich die Empfehlung ausgesprochen, im „Zweifelsfall“ neben der ergänzenden Evaluation eines weiteren Tumorgewebeschnitts explizit alternative Marker in die Reflex-Testung mit einzubeziehen und damit ggf. den diagnostischen Befund „Her2-positiv“ oder „Her2-negativ“ zu erzielen und so die Kohorte der zweifelhaften Fälle gering zu halten [66],[67]. An den Mayo Medical Laboratories wird bei Her2/Cen17-zweifelhaften Fällen inzwischen auf 17p-Marker zurückgegriffen: Der Genlocus D17S122 wurde bereits in zytogenetisches Reflex-Testen implementiert [107].

2.4 Zusammenfassung

Tumoren mit einer erhöhten Cen17-Kopienzahl scheinen eine heterogene Gruppe zu repräsentieren mit komplexen chromosomalen Alterationen. Die fragwürdige Annahme, dass das Cen17-Signal mit der Häufigkeit von Chromosom 17 korrespondiert, mag zahlreiche Inkonsistenzen bezüglich Polysomie 17 in der wissenschaftlichen Literatur erklären.

Auf der Grundlage zytogenetischer Untersuchungen sowie aCGH-Analysen der vorliegenden Studie wird evident, dass eine signifikante Anzahl von Tumoren mit erhöhter Cen17-Anzahl nicht auf eine Multiplikation des gesamten Chromosom 17, sondern lediglich auf partielle Amplifikationen der Zentromer 17-Region zurückzuführen ist: Die isolierte Interpretation der dadurch fälschlicherweise erniedrigten Her2/Cen17 Ratio ermöglicht keine korrekte Aussage über den Her2-Status. Die Betrachtung der absoluten Her2-Anzahl bei Tumoren mit erhöhter Cen17-Zahl als ausschließliches Positivitätskriterium vermeidet eine Unterschätzung des Her2-Status und minimiert das Risiko, bedürftigen Patienten eine Trastuzumab-Therapie irrtümlicherweise vorzuenthalten [65]. Übereinstimmend mit Untersuchungen anderer Autoren wird in der vorliegenden Studie deutlich, dass "echte" Polysomie 17 ein eher seltenes Ereignis zu sein scheint, während Cen17 eine zu hohe Inzidenz von Polysomie 17 suggeriert. Somit ist die Anzahl von Cen17-Hybridisierungssignalen, die streng genommen nur die Häufigkeit der Zentromer-Region widerspiegelt, nicht repräsentativ für die tatsächliche Anzahl des gesamten Chromosoms 17. Damit ist Cen17 kein korrekter und kein zuverlässiger Indikator einer "echten" Polysomie 17 [55].

Die Verwendung hochauflösender, DNA-basierter Techniken wie aCGH kann dabei helfen, den Chromosom 17-Status genauer zu definieren und die biologische Signifikanz genetischer Aberrationen zu klären [7],[26]. Dennoch erscheint es schwierig und sicherlich kostenaufwendig, eine aCGH-gestützte DNA-Analyse oder andere genomische Annäherungen in die klinisch-pathologische Diagnostik zu integrieren. Eine Alternative dafür könnte die Evaluation eines "Marker-Kombinations-Score" darstellen. Da in Mammakarzinomen der lange Arm 17q tendenziell eher Zugewinne mitbringt und 17p (z. B. TP53, RAI1 und D17S122) eher Verluste zeigt, könnte ein Wert, der gleichermaßen eine 17p- und ein 17q-lokalisierte, chromosomale Region berücksichtigt, ein geeigneterer Referenzwert für die Anzahl von Chromosom 17 sein. Die kombinierte Betrachtung von 17p- und 17q-Markern stellt eine plausible Rationale dar, die die zytogenetische Her2-Testung verbessern könnte und eine adäquate Bestimmung des Her2-Status erlaubt. Der "Marker-Kombinations-Score" differenziert nicht nur zwischen Disomie und "echter" Polysomie 17, sondern hält

gleichzeitig die Gruppe der therapeutisch-strittigen zweifelhaften Fälle gering, was im Zuge der stetig anwachsenden zweifelhaften Fälle unter den aktualisierten ASCO/CAP-Richtlinien (2013) essentiell ist.

Bislang ist mit dieser Arbeit rein analytisch, d. h. rechnerisch gezeigt worden, dass ein "Marker-Kombinations-Score" die bisher zweifelhaften diagnostischen Fälle differenzieren könnte. Die Nützlichkeit, d. h. die klinische Relevanz eines "Marker-Kombinations-Scores" muss aber auf Basis größerer Brustkrebskohorten evaluiert und durch interlaboratorische, dezentralisierte Ringstudien nachgewiesen werden. Es sind prospektive Behandlungsanalysen wichtig, die zeigen, inwieweit der "Marker-Kombinations-Score" die Stratifikation von Brustkrebspatienten und individuelle Therapieentscheidungen in der klinisch-onkologischen Praxis tatsächlich verbessert und möglicherweise Patienten, denen nach bisherigen diagnostischen Kriterien eine Her2-gerichtete Therapie verwehrt war, nachträglich eine Behandlung ermöglicht. Außerdem sind prospektive klinische Studien unerlässlich, die das Outcome und Therapieansprechen "echt" polysomer Tumoren gesondert von Tumoren mit Her2/Cen17-Koamplifikation und solchen mit solitärer Her2-Amplifikation ohne Cen17-Koamplifikation untersuchen. Nur so können die verschiedenen Krankheitsbilder zukünftig voneinander abgegrenzt, behandelt und Unklarheiten bezüglich der Vielfalt an Tumoren mit Cen17-Amplifikationen beseitigt werden.

3 Anhang

3.1 Zu 1.1 Bedeutung einer Her2-Überexpression beim invasiven Mammakarzinom

Gene ID	Name	Location	Functions
2064	ERBB2/HER2	17q21.1	Epidermal growth factor (EGF) receptor family of receptor tyrosine kinases. Amplification and/or overexpression have been reported in numerous cancers.
7153	TOP2A	17q21-q22	DNA topoisomerase, controls and alters the topologic states of DNA during transcription. It is associated with the development of drug resistance.
201299	RDM1	17q11.2	RAD52 protein encoded by RDM1 is involved in DNA double-strand break repair and recombination event. Disruption of the RDM1 gene resulted in an increased sensitivity to the anti-cancer drug cisplatin.
7157	P53	17p13.1	P53 responds to diverse cellular stresses to regulate target genes that induce cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair. It is accumulated in a variety of transformed cells.
672	BRCA1	17q21	BRCA1 plays a role in maintaining genomic stability. It acts as a tumor suppressor. BRCA1 combines with other tumor suppressors, to form a BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC). Mutations in this gene are responsible for approximately 40% of inherited breast cancers and more than 80% of inherited breast and ovarian cancers.
3090	HIC-1	17p13.3	Hypermethylated in cancer 1, a candidate tumor suppressor gene which undergoes allelic loss in breast and other human cancers. The human HIC-1 gene is a target gene of p53.
4137	TAU	17q21.1	Microtubule-associated protein TAU (MAPT), functions to keep cell shape, microvesicle transportation and spindle formation. Interfering spindle microtubule dynamics will cause cell cycle arrest and apoptosis. TAU detection helps to identify those patients who are most likely to benefit from taxane treatment and resistant to paclitaxel treatment.

Abbildung 33: Gene auf Chromosom 17 [5]

3.2 Zu 1.4 Richtlinien für die pathologische Her2-Diagnostik

Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
Specimens to be tested	All primary breast cancer specimens and metastases should have at least one HER2 test performed	All newly diagnosed patients with breast cancer must have a HER2 test performed. Patients who then develop metastatic disease must have a HER2 test performed in a metastatic site, if tissue sample is available.
Optimal algorithm for HER2 testing	<p>Positive for HER2 is either IHC HER2 3+ (defined as uniform intense membrane staining of > 30% of invasive tumor cells) or FISH amplified (ratio of <i>HER2</i> to <i>CEP17</i> of > 2.2 or average <i>HER2</i> gene copy number > 6 signals/nucleus for those test systems without an internal control probe</p> <p>Equivocal for HER2 is defined as: IHC 2+ or FISH <i>HER2/CEP17</i> ratio of 1.8-2.2 or average <i>HER2</i> gene copy number 4-6 <i>HER2</i> signals/nucleus for test systems without an internal control probe</p>	<p>Must report HER2 test result as positive for HER2 if:^{a,b}</p> <ul style="list-style-type: none"> ● IHC 3+ based on circumferential membrane staining that is complete, intense^{c,d} ● ISH positive based on: <ul style="list-style-type: none"> ● Single-probe average <i>HER2</i> copy number ≥ 6.0 signals/cell^{c,e} ● Dual-probe <i>HER2/CEP17</i> ratio $\geq 2.0^{c,e}$ with an average <i>HER2</i> copy number ≥ 4.0 signals per cell ● Dual-probe <i>HER2/CEP17</i> ratio $\geq 2.0^{c,e}$ with an average <i>HER2</i> copy number < 4.0 signals/cell^b ● Dual-probe <i>HER2/CEP17</i> ratio < 2.0^{c,e} with an average <i>HER2</i> copy number ≥ 6.0 signals/cell <p>Must report HER2 test result as equivocal and order reflex test (same specimen using the alternative test) or new test (new specimen, if available, using same or alternative test) if:^{a,b}</p> <ul style="list-style-type: none"> ● IHC 2+ based on circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak/moderate¹ and within > 10% of the invasive tumor cells^d or complete and circumferential membrane staining that is intense and within $\leq 10\%$ of the invasive tumor cells^d ● ISH equivocal based on: <ul style="list-style-type: none"> ● Single-probe ISH average <i>HER2</i> copy number ≥ 4.0 and < 6.0 signals/cell^{e,f} ● Dual-probe <i>HER2/CEP17</i> ratio < 2.0 with an average <i>HER2</i> copy number ≥ 4.0 and < 6.0 signals/cell^{e,f} <p>Must report HER2 test result as negative if a single test (or both tests) performed show:^{a,b}</p> <ul style="list-style-type: none"> ● IHC 1+ as defined by incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within > 10% of the invasive tumor cells^d ● IHC 0 as defined by no staining observed^d or membrane staining that is incomplete and is faint/barely perceptible and within $\leq 10\%$ of the invasive tumor cells^d ● ISH negative based on: <ul style="list-style-type: none"> ● Single-probe average <i>HER2</i> copy number < 4.0 signals/cell ● Dual-probe <i>HER2/CEP17</i> ratio < 2.0 with an average <i>HER2</i> copy number < 4.0 signals/cell <p>Must report HER2 test result as indeterminate if technical issues prevent one or both tests (IHC and ISH) from being reported as positive, negative, or equivocal.</p> <p>Conditions may include:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Inadequate specimen handling ● Artifacts (crush or edge artifacts) that make interpretation difficult ● Analytic testing failure <p>Another specimen should be requested for testing to determine HER2 status. Reason for indeterminate testing should be noted in a comment in the report.</p>
	<p>Negative for HER2 is defined as:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● IHC HER2 0: no staining ● IHC HER2 1+: weak incomplete membrane staining in any proportion of tumor cells or weak, complete membrane staining in < 10% of cells ● FISH <i>HER2/CEP17</i> ratio of < 1.8 or average <i>HER2</i> gene copy number of < 4 signals/nucleus for test systems without an internal control probe <p>Indeterminate for HER2</p>	

Abbildung 34: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]

Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
ISH rejection criteria	<p>Test is rejected and repeated if:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Controls are not as expected ● Observer cannot find and count at least two areas of invasive tumor ● > 25% of signals are unscorable due to weak signals ● > 10% of signals occur over cytoplasm ● Nuclear resolution is poor ● Autofluorescence is strong 	Same and report HER2 test result as indeterminate as per parameters described immediately above.
ISH interpretation	<p>Interpretation performed by counting at least 20 cells; a pathologist must confirm that counting involved invasive tumor criteria followed</p>	<p>The pathologist should scan the entire ISH slide prior to counting at least 20 cells or use IHC to define the areas of potential HER2 amplification.</p> <p>If there is a second population of cells with increased HER2 signals/cell, and this cell population consists of more than 10% of tumor cells on the slide (defined by image analysis or visual estimation of the ISH or IHC slide), a separate counting of at least 20 nonoverlapping cells must also be performed within this cell population and reported.</p> <p>For bright-field ISH, counting requires comparison between patterns in normal breast and tumor cells because artifactual patterns may be seen that are difficult to interpret. If tumor cell pattern is neither normal nor clearly amplified, test should be submitted for expert opinion.</p>
Acceptable (IHC and ISH) tests ⁹	<p>Test is rejected and repeated or tested by FISH if:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Controls are not as expected ● Artifacts involve most of sample ● Sample has strong membrane staining of normal breast ducts (internal controls) 	Should preferentially use an FDA-approved IHC, bright-field ISH, or FISH assay. ^{9,h}
Optimal IHC testing requirements	<p>Test is rejected and repeated or tested by FISH if:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Controls are not as expected ● Artifacts involve most of sample ● Sample has strong membrane staining of normal breast ducts (internal controls) 	Same
IHC interpretation criteria	<p>Positive HER2 result requires homogeneous, dark circumferential (chicken wire) pattern in > 30% of invasive tumor. Interpreters have method to maintain consistency and competency</p>	Should interpret IHC test using a threshold of more than 10% of tumor cells that must show homogeneous, dark circumferential (chicken wire) pattern to call result 3+, HER2 positive.
Reporting requirements for all assay types	<p>Report must include guideline-detailed elements</p>	Same except for changes to reporting requirement and algorithms defined in this table (Data Supplements 9 and 10).
Optimal tissue handling requirements	<p>Time from tissue acquisition to fixation should be as short as possible; samples for HER2 testing are fixed in 10% neutral buffered formalin for 6-48 hours; cytology specimens must be fixed in formalin.</p> <p>Samples should be sliced at 5- to 10-mm intervals after appropriate gross inspection and margins designation and placed in sufficient volume of neutral buffered formalin</p>	Duration of fixation has been changed from 6-48 hours to 6-72 hours . Any exceptions to this process must be included in report.
Optimal tissue sectioning requirements	<p>Sections should ideally not be used for HER2 testing if cut > 6 weeks earlier; this may vary with primary fixation or storage conditions</p>	Same
Optimal internal validation procedure	<p>Validation of test must be performed before test is offered</p>	Same (Data Supplement 12 lists examples of various external quality assurance schemes)
Optimal initial test validation	<p>Initial test validation requires 25-100 samples tested by alternative validated method in the same laboratory or by validated method in another laboratory</p>	Laboratories performing these tests should be following all accreditation requirements, one of which is initial testing validation. The laboratory should ensure that initial validation conforms to the published 2010 ASCO/CAP recommendations for IHC testing of ER and PgR guideline validation requirements with 20 negative and 20 positive for FDA-approved assays and 40 negative and 40 positive for LDTs. This requirement does not apply to assays that were previously validated in conformance with the 2007 ASCO/CAP HER2 testing guideline and to those who are routinely participating in external proficiency testing for HER2 tests, such as the program offered by CAP (Data Supplement 12).
	<p>Proof of initial testing validation in which positive and negative HER2 categories are 90% concordant with alternative validated method or same validated method for HER2</p>	Laboratories are responsible for ensuring the reliability and accuracy of their testing results, by compliance with accreditation and proficiency testing requirements for HER2 testing assays. Specific concordance requirements are not required (Data Supplement 11).

Abbildung 35: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]

Topic	2007 Recommendation	2013 Recommendation
Optimal monitoring of test concordance between methods	Concordance testing must be performed prior to initiation of testing, optimally as the form of testing validation. If concordance is below 95% for any testing category, that category of test result of either FISH or IHC must be automatically flexed to alternative method before final interpretation	See text under Optimal Laboratory Accreditation.
Optimal internal QA procedures	<p>Ongoing quality control and equipment maintenance</p> <p>Initial and ongoing laboratory personnel training and competency assessment</p> <p>Use of standardized operating procedures including routine use of control materials</p> <p>Revalidation of procedure if changed</p> <p>Ongoing competency assessment and education of pathologists</p>	<p>Should review and document external and internal controls with each test and each batch of tests.</p> <p>Same</p> <p>Same</p> <p>Same</p> <p>Same</p> <p>Should perform ongoing competency assessment and document the actions taken as a part of the laboratory record.</p>
Optimal external proficiency assessment	<p>Participation in and successful completion of external proficiency testing program with at least two testing events (mailings) a year</p> <p>Satisfactory performance requires at least 90% correct responses on graded challenges for either test</p> <ul style="list-style-type: none"> Unsatisfactory performance will require laboratory to respond according to accreditation agency program requirements 	<p>Same</p> <p>Same</p>
Optimal laboratory accreditation	<p>Onsite inspection every other year with annual requirement for self-inspection</p> <ul style="list-style-type: none"> Reviews laboratory validation, procedures, QA results and processes, results, and reports Unsatisfactory performance results in suspension of laboratory testing for HER2 for that method 	Same (Data Supplement 11)

NOTE: For all recommendations, evidence quality and recommendation strength are strong, except as noted. Bold font indicates changes in the updated version. Abbreviations: ASCO, American Society of Clinical Oncology; CAP, College of American Pathologists; ER, estrogen receptor; FDA, US Food and Drug Administration; FISH, fluorescent in situ hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization; LDT, laboratory-developed test; PgR, progesterone receptor; QA, quality assurance.

^aIf a reflex test (same specimen/same tissue) ordered after an initial equivocal HER2 test result does not render a positive or negative HER2 test result, the pathologist should review histopathologic features, confer if possible with the oncologist regarding additional HER2 testing, and document it in the pathology report. The pathologist may pursue additional HER2 testing without conferring with the oncologist. This should be accomplished using: (1) the alternative test (IHC or ISH) on the same specimen, (2) either test on another block (same specimen), or (3) either test on another specimen (eg, core biopsy, surgical resection, lymph node, and/or metastatic site). Because the decision to recommend HER2-targeted therapy requires a HER2-positive test result, additional HER2 testing should be attempted in equivocal specimens to attempt to obtain a positive or negative HER2 test result and most accurately determine the HER2 status of the tumor specimen.

^bSee Data Supplement 2E for additional information on rare scenarios.

^cObserved in a homogeneous and contiguous population and within > 10% of the invasive tumor cells.

^dReadily appreciated using a low-power objective.

^eBy counting at least 20 cells within the area.

^fObserved in a homogeneous and contiguous population.

^gAlternatively, a laboratory accredited by CAP or another accrediting entity may choose to use an LDT, in which case its analytical performance must be documented in the same clinical laboratory that will use the assay, and documentation of analytical validity of the assay must be available.

^hA list of HER2 assays approved by the FDA as in vitro companion diagnostic devices to aid in the assessment of patients for whom trastuzumab treatment is being considered can be found in the Medical Devices section of the US FDA Web site (http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/devicesatfda/index.cfm?start_search=1&search_term=HER2&approval_date_from=&approval_date_to=07/14/2013&sort=approvaldatedesc&pagenum=10; last checked July 14, 2013). The product package insert for trastuzumab and pertuzumab prepared by the FDA indicates that "HER2 testing should be performed using FDA-approved tests by laboratories with demonstrated proficiency."^{7,78}

Abbildung 36: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]

3.3 Zu 2.1.1 Probenauswahl und Gewebskollektive

BENIGNES GEWEBEKOLLEKTIV

<i>ID</i>	<i>IHC</i>	<i>Cen17 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Cen17</i>	<i>ASCO/CAP</i>
1	fehlt	2.12	2.05	0.97	negativ
2	fehlt	1.90	1.95	1.02	negativ
3	fehlt	2.08	2.13	1.03	negativ
4	fehlt	1.98	2.02	1.02	negativ
5	fehlt	2.08	2.00	0.96	negativ
6	fehlt	1.98	1.99	1.00	negativ
7	fehlt	1.96	1.96	1.00	negativ
8	fehlt	1.96	1.94	0.99	negativ
9	fehlt	1.96	2.05	1.05	negativ
10	fehlt	1.98	1.97	1.00	negativ
11	fehlt	1.97	2.02	1.03	negativ
12	fehlt	1.93	1.33	0.69	negativ
13	fehlt	1.92	1.92	1.00	negativ
14	fehlt	1.93	1.33	0.69	negativ
15	fehlt	2.08	2.07	0.99	negativ
16	fehlt	2.04	2.03	1.00	negativ
17	fehlt	1.98	1.96	0.99	negativ
18	fehlt	1.97	2.00	1.02	negativ
19	fehlt	2.08	1.97	0.95	negativ
20	fehlt	1.98	1.31	0.66	negativ

Tabelle 9: Benignes Gewebekollektiv, 20 Patienten

NICHT-POLYSOMES/NICHT-HER2-AMPLIFIZIERTES TUMORKOLLEKTIV

<i>ID</i>	<i>ICH</i>	<i>Cen17 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Cen17</i>	<i>ASCO/CAP</i>
1	2	1.80	1.83	1.02	negativ
2	2	2.19	2.25	1.03	negativ
3	2	1.90	2.00	1.05	negativ
4	2	1.96	1.95	0.99	negativ
5	2	2.00	1.96	0.98	negativ
6	2	2.07	2.05	0.99	negativ
7	2	1.87	1.95	1.04	negativ
8	2	2.08	2.15	1.03	negativ
9	2	2.00	2.08	1.04	negativ
10	2	1.92	1.99	1.03	negativ
11	2	1.92	2.00	1.04	negativ
12	2	1.20	1.21	1.01	negativ
13	2	1.87	1.88	1.00	negativ
14	2	1.94	2.03	1.04	negativ
15	2	2.02	2.03	1.00	negativ
16	2	2.05	1.98	0.97	negativ
17	2	1.98	1.32	0.67	negativ
18	2	1.88	1.95	1.04	negativ
19	2	2.02	2.00	0.99	negativ
20	2	1.74	1.88	1.08	negativ
21	2	1.89	1.99	1.06	negativ
22	2	1.98	2.01	1.02	negativ
23	2	2.11	1.35	0.64	negativ
24	2	1.96	2.03	1.03	negativ
25	2	1.96	1.96	1.00	negativ
26	2	2.13	2.38	1.12	negativ
27	2	2.02	2.05	1.02	negativ
28	2	2.14	2.11	0.98	negativ
29	2	1.94	1.97	1.02	negativ
30	2	2.00	1.95	0.98	negativ
31	2	1.84	1.96	1.07	negativ
32	2	2.00	1.33	0.67	negativ
33	2	1.93	1.99	1.04	negativ
34	2	1.96	2.01	1.02	negativ
35	2	2.00	2.00	1.00	negativ
36	2	1.96	2.01	1.03	negativ
37	2	2.00	1.95	0.97	negativ
38	2	1.95	2.01	1.03	negativ
39	2	1.95	2.00	1.03	negativ
40	2	1.90	2.13	1.12	negativ
41	2	2.02	2.07	1.02	negativ
42	2	1.77	1.95	1.10	negativ
43	2	1.98	2.00	1.01	negativ

44	2	2.05	2.10	1.03	negativ
45	2	2.14	2.18	1.02	negativ
46	2	1.89	1.93	1.02	negativ
47	2	1.01	1.11	1.11	negativ
48	2	1.86	1.99	1.07	negativ
49	2	1.22	1.16	0.95	negativ
50	2	1.90	1.91	1.00	negativ
51	2	1.70	1.91	1.12	negativ
52	2	1.72	1.96	1.14	negativ

Tabelle 10: Nicht-polysomes, nicht-Her2-amplifiziertes Tumorkollektiv, 52 Patienten

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

<i>ID</i>	<i>IHC</i>	<i>Cen17 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Cen17</i>	<i>ASCO/CAP</i>
1	3	1.76	15.45	8.78	positiv
2	3	1.22	2.49	2.04	positiv
3	3	2.64	15.80	5.98	positiv
4	3	3.11	14.99	4.83	positiv
5	3	1.24	8.13	6.56	positiv
6	3	3.25	16.89	5.20	positiv
7	3	2.02	14.75	7.30	positiv
8	3	3.20	14.49	4.53	positiv
9	3	2.02	19.33	9.57	positiv
10	3	2.10	15.80	7.52	positiv
11	3	1.45	3.86	2.66	positiv
12	3	3.48	17.10	4.91	positiv
13	3	1.67	17.10	10.27	positiv
14	3	2.76	5.87	2.13	positiv
15	3	3.62	20.00	5.52	positiv
16	3	2.96	10.20	3.45	positiv
17	3	1.88	14.07	7.48	positiv
18	3	3.22	16.33	5.07	positiv
19	3	2.10	15.60	7.43	positiv
20	3	2.68	16.24	6.06	positiv
21	3	1.95	14.62	7.50	positiv
22	3	1.64	3.69	2.25	positiv
23	3	1.70	16.53	9.73	positiv
24	3	2.70	14.93	5.53	positiv
25	3	2.00	20.00	10.00	positiv
26	3	1.44	14.67	10.19	positiv
27	3	2.42	19.53	8.07	positiv
28	3	1.87	16.50	8.82	positiv
29	3	1.90	4.81	2.53	positiv
30	3	3.43	9.58	2.80	positiv
31	3	1.72	10.67	6.20	positiv
32	3	3.72	20.00	5.38	positiv
33	3	2.18	9.60	4.40	positiv
34	3	2.54	13.93	5.49	positiv
35	3	1.56	12.87	8.27	positiv
36	3	1.93	3.94	2.04	positiv
37	3	2.64	6.13	2.32	positiv
38	3	2.31	17.67	7.66	positiv
39	3	3.90	15.40	3.95	positiv
40	3	1.98	19.80	10.00	positiv
41	3	1.96	13.13	6.70	positiv
42	3	2.04	20.00	9.80	positiv
43	3	1.92	12.83	6.68	positiv

44	3	6.52	20.00	3.07	positiv
45	3	2.30	20.00	8.70	positiv
46	3	2.26	19.33	8.55	positiv
47	3	2.14	17.33	8.10	positiv
48	3	2.84	5.70	2.01	positiv
49	3	2.34	15.07	6.44	positiv
50	3	4.56	10.44	2.29	positiv
51	3	1.68	20.00	11.90	positiv
52	3	2.10	18.83	8.99	positiv
53	3	3.52	11.00	3.13	positiv
54	3	2.05	20.00	9.78	positiv
55	3	3.08	10.20	3.31	positiv
56	3	2.62	11.76	4.49	positiv
57	3	2.18	19.67	9.04	positiv
58	3	2.84	19.33	6.81	positiv
59	3	5.64	19.70	3.49	positiv
60	3	1.86	16.67	8.96	positiv
61	3	3.86	13.49	3.50	positiv
62	3	2.44	17.93	7.35	positiv
63	3	3.16	12.07	3.82	positiv
64	3	2.76	12.73	4.61	positiv
65	3	3.26	11.16	3.42	positiv
66	3	2.08	7.47	3.59	positiv
67	3	1.76	10.80	6.14	positiv
68	3	3.30	11.27	3.41	positiv
69	3	2.05	18.94	9.24	positiv
70	3	2.48	11.35	4.58	positiv
71	3	1.96	9.40	4.81	positiv
72	3	1.86	16.40	8.82	positiv
73	3	4.12	11.67	2.83	positiv
74	3	1.74	19.67	11.30	positiv
75	3	3.68	11.00	2.99	positiv
76	3	1.55	15.00	9.68	positiv
77	3	2.50	4.87	1.95	positiv
78	3	2.45	4.87	1.99	positiv

Tabelle 11: Her2-positives Tumorkollektiv, 78 Patienten

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

<i>ID</i>	<i>IHC</i>	<i>Cen17 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Nucleus</i>	<i>HER2 / Cen17</i>	<i>ASCO/CAP</i>
1	2	2.62	2.69	1.03	negativ
2	2	2.26	2.51	1.11	negativ
3	2	2.92	4.12	1.41	equivocal
4	2	4.60	5.17	1.12	equivocal
5	2	4.41	8.79	1.99	positiv
6	2	2.90	4.07	1.40	equivocal
7	2	2.94	3.20	1.09	negativ
8	2	2.82	3.00	1.06	negativ
9	2	2.32	2.59	1.11	negativ
10	2	2.42	2.85	1.18	negativ
11	2	2.98	3.15	1.06	negativ
12	2	3.20	3.61	1.13	negativ
13	2	2.52	2.75	1.09	negativ
14	2	3.10	4.36	1.41	equivocal
15	2	2.40	2.55	1.06	negativ
16	2	3.89	4.25	1.09	equivocal
17	2	2.30	2.30	1.00	negativ
18	2	2.84	3.00	1.06	negativ
19	2	3.32	3.51	1.06	negativ
20	2	3.04	3.39	1.11	negativ
21	2	3.54	3.91	1.10	negativ
22	2	2.54	3.68	1.45	negativ
23	2	3.53	3.57	1.01	negativ
24	2	2.46	2.25	0.92	negativ
25	2	4.40	4.79	1.09	equivocal
26	2	2.92	3.44	1.18	negativ
27	2	4.12	4.77	1.16	equivocal
28	2	2.52	3.43	1.36	negativ
29	2	2.56	4.02	1.57	equivocal
30	2	3.28	3.75	1.14	negativ
31	2	3.38	3.53	1.05	negativ
32	2	3.32	2.13	0.64	negativ
33	2	3.22	3.83	1.19	negativ
34	2	3.26	3.55	1.09	negativ
35	2	3.90	5.09	1.31	equivocal
36	2	3.00	3.76	1.25	negativ
37	2	3.56	3.89	1.09	negativ
38	2	2.80	4.01	1.43	equivocal
39	2	2.34	4.47	1.91	equivocal
40	2	2.30	2.89	1.26	negativ
41	2	2.76	2.84	1.03	negativ
42	2	2.90	2.83	0.97	negativ
43	2	3.22	3.63	1.13	negativ

44	2	2.94	3.51	1.19	negativ
45	2	3.40	3.53	1.04	negativ
46	2	3.98	4.71	1.18	equivocal
47	2	3.02	3.49	1.16	negativ
48	2	3.12	3.91	1.25	negativ
49	2	4.26	13.53	3.18	positiv
50	2	2.90	2.76	0.95	negativ
51	2	3.32	5.75	1.73	equivocal
52	2	5.58	20.00	3.58	positiv
53	2	2.98	3.56	1.19	negativ
54	2	2.76	2.91	1.05	negativ
55	2	4.10	3.84	0.94	negativ
56	2	3.64	3.83	1.05	negativ
57	2	4.16	4.48	1.08	equivocal
58	2	5.18	5.69	1.10	equivocal
59	2	4.34	3.60	0.83	negativ
60	2	6.80	9.18	1.35	positiv
61	2	5.46	6.01	1.10	positiv
62	2	6.08	6.49	1.07	positiv
63	2	3.48	3.41	0.98	negativ
64	2	3.42	3.77	1.10	negativ
65	2	3.54	3.60	1.02	negativ
66	2	2.80	2.96	1.06	negativ
67	2	4.60	4.41	0.96	equivocal
68	2	3.40	3.76	1.11	negativ
69	2	3.48	3.76	1.08	negativ
70	2	3.62	3.81	1.05	negativ
71	2	4.80	3.63	0.76	negativ
72	2	3.22	3.56	1.11	negativ
73	2	5.81	6.09	1.05	positiv
74	2	3.06	3.17	1.04	negativ
75	2	2.96	3.71	1.25	negativ
76	2	3.53	3.46	0.98	negativ
77	2	2.64	2.85	1.08	negativ
78	2	3.53	3.48	0.99	negativ
79	2	2.36	2.33	0.99	negativ
80	2	4.98	6.28	1.26	positiv
81	2	2.30	2.73	1.19	negativ
82	2	3.56	9.68	2.72	positiv

Tabelle 12: Potentiell polysomes Tumorkollektiv, 82 Patienten

3.4 Zu 2.1.3 Design und Generierung der Hybridisierungssonden

In der Tumordatenbank des "Broad Institute of MIT and Harvard" wurde deutlich, dass der lange Arm 17p im Vergleich zum kurzen Arm 17q häufiger Amplifikationen aufweist:

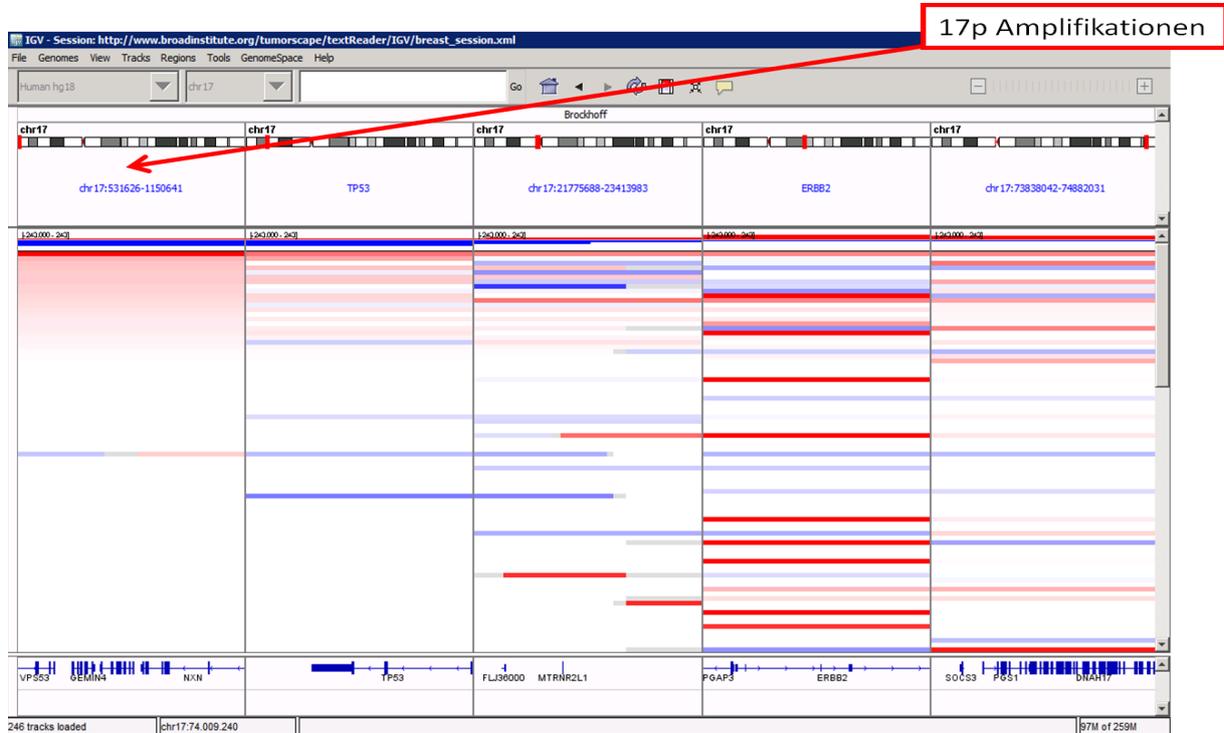


Abbildung 37: 17p-Amplifikationen [108]



Abbildung 38: 17q-Amplifikationen [108]

Auch die häufige Koamplifikation von Cen17 und Her2 wurde manifest:

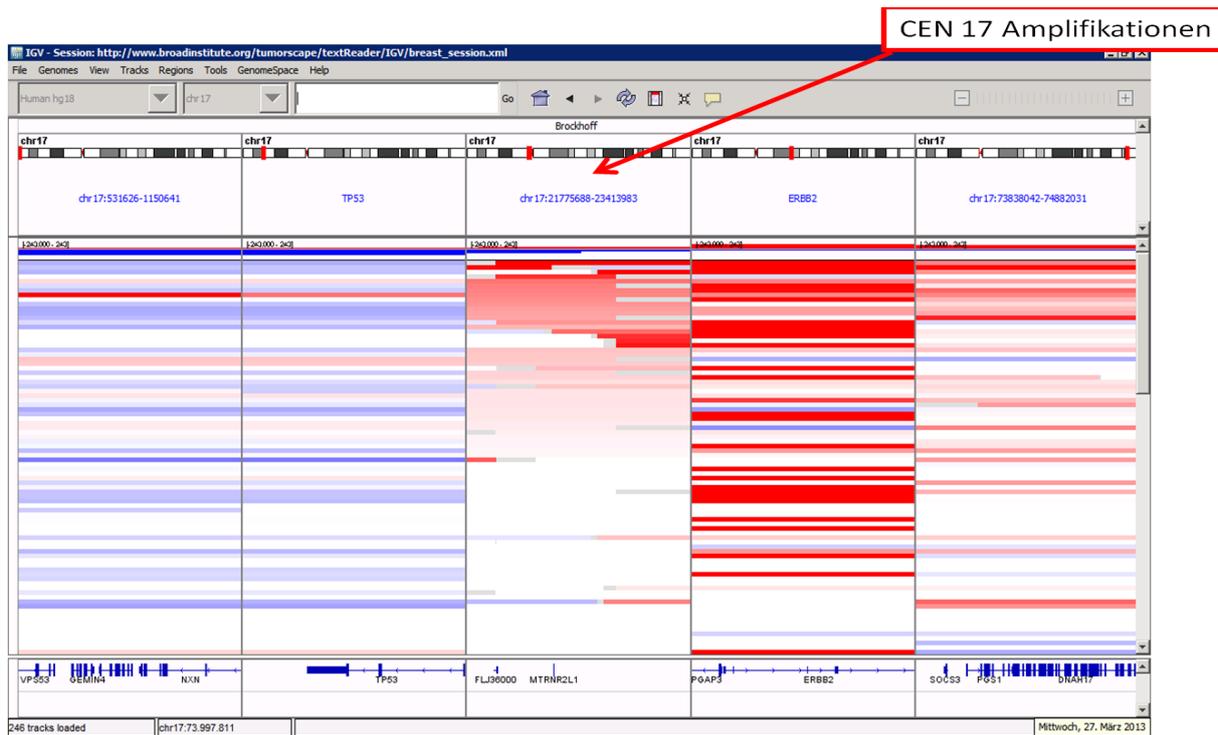


Abbildung 39: Cen17-Amplifikationen [108]

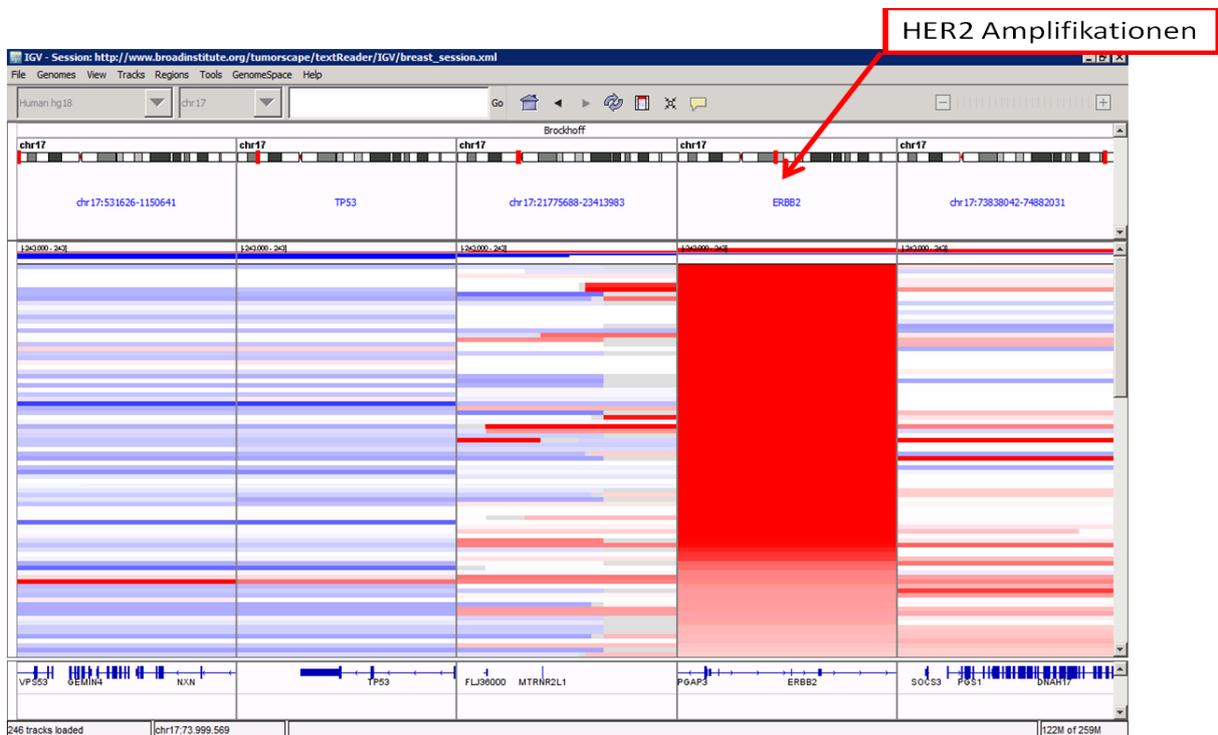


Abbildung 40: Her2/ERBB2-Amplifikationen [108]

3.5 Zu 2.2.8 aCGH-Daten

Die übrigen aCGH-Fälle werden nachfolgend aufgezeigt:

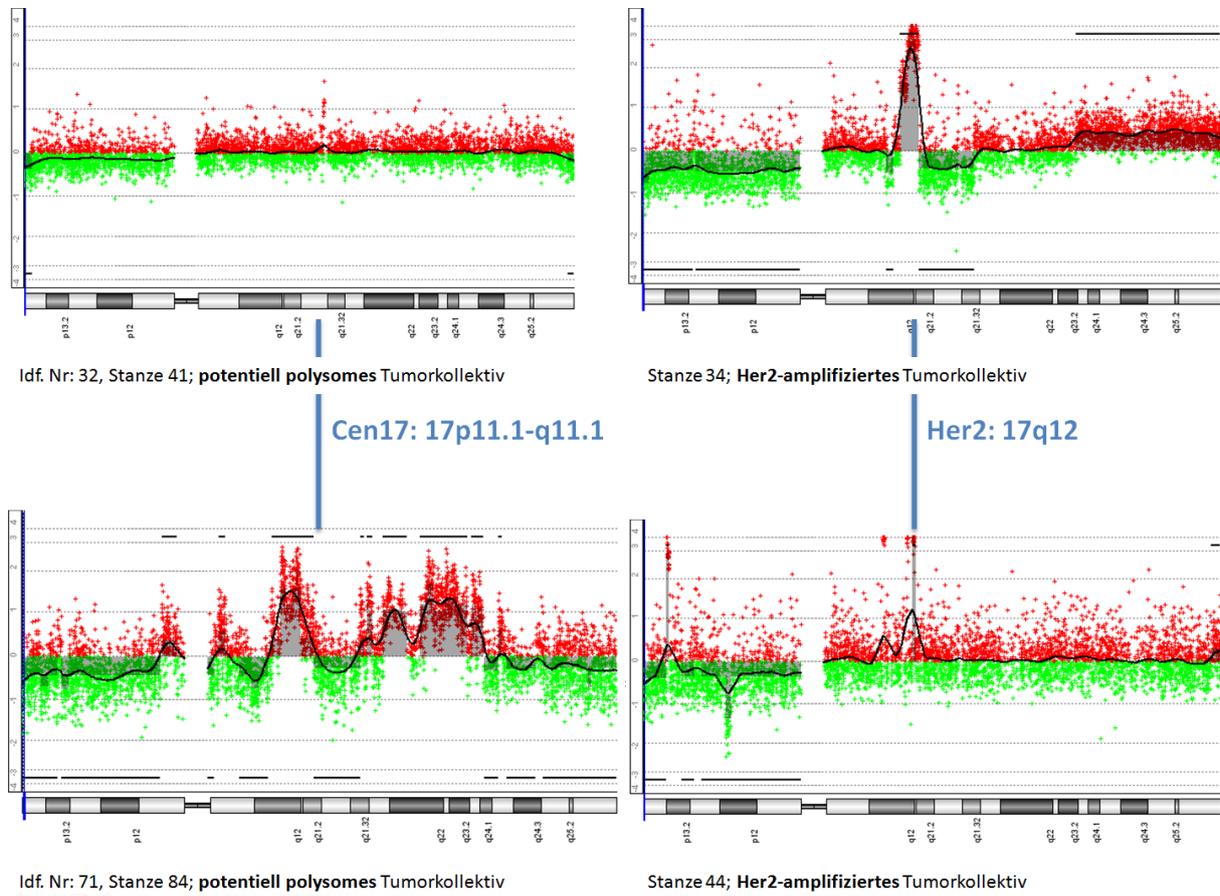


Abbildung 41: Restliche 4/11 CGH-Fälle

2/11 Proben (Stanze 34 und Stanze 44) stammen aus dem Her2-amplifizierten (Her2-positiven) Tumorkollektiv. Beide Stanzen zeigen eine deutliche Her2-Amplifikation bei 17q12. Stanze 44 weist zusätzlich eine Koamplifikation von Cen17 auf.

2/11 Proben (Idf. Nr. 32 und 71 - Stanze 41 und 84) stammen aus dem potentiell polysomen Tumorkollektiv.

Stanze 84 zeigt deutliche Amplifikationen auf 17q in Form von nahe beieinander liegenden Peaks ("firestorm pattern").

Stanze 41 zeigt einen leichten Zugewinn von Cen17.

3.6 Zu 2.2.11 Her2-Status von ASCO/CAP 2007/2013 im Vergleich

Die Abbildungen zeigen die Klassifikationsveränderungen unter dem aktuellen Leitfaden 2013 im Vergleich zu 2007.

POTENTIELL POLYSOMES TUMORKOLLEKTIV

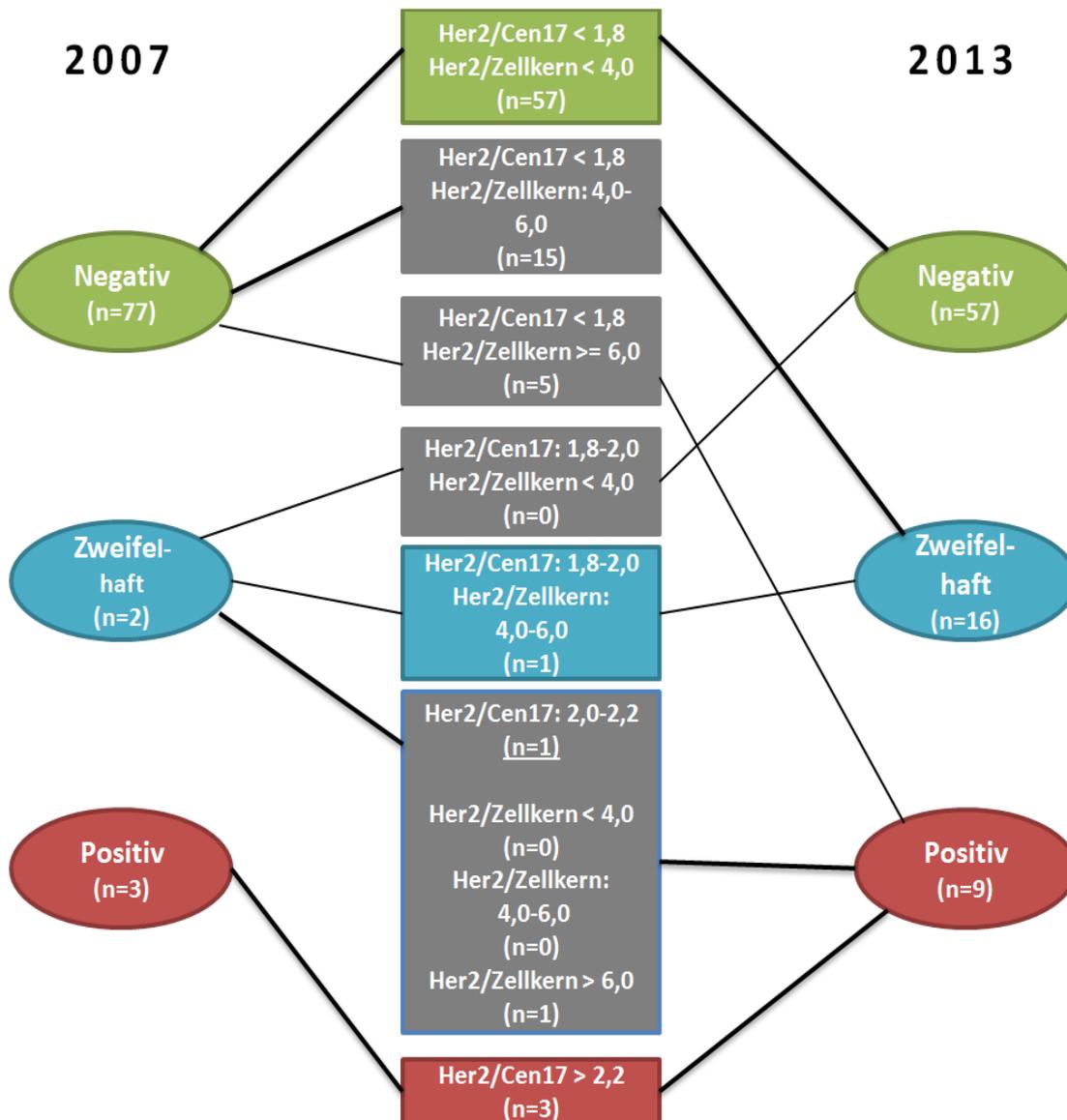


Abbildung 42: Her2-Status von ASCO/CAP 2007 (links) und 2013 (rechts) für potentiell polysomes Tumorkollektiv

HER2-POSITIVES TUMORKOLLEKTIV

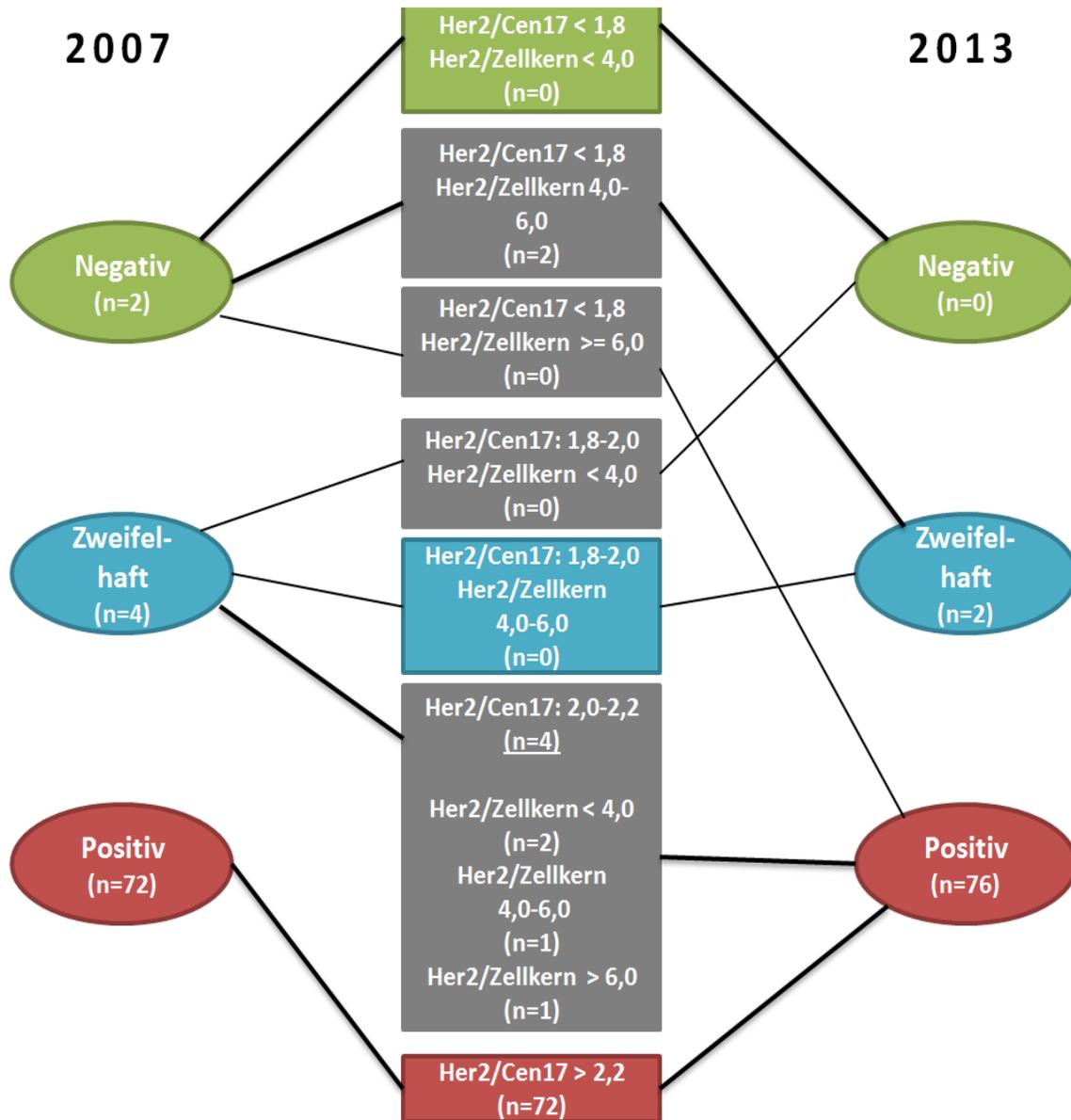


Abbildung 43: Her2-Status von ASCO/CAP 2007 (links) und 2013 (rechts) für Her2-positives Tumorkollektiv

3.7 Zu 2.3 Diskussion

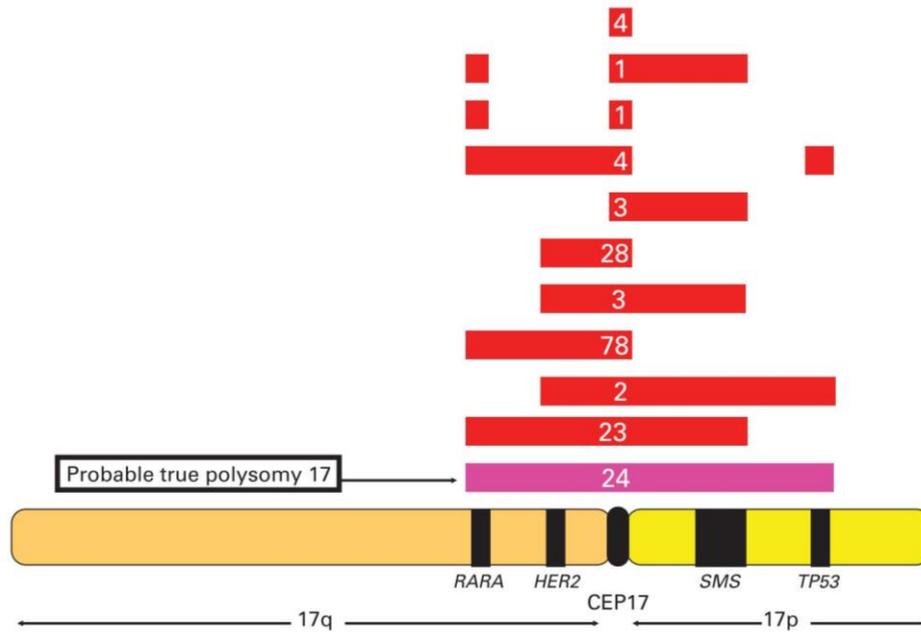


Abbildung 44: "Echte" Polysomie unter 171 Fällen mit Cen17-Zugewinn (Cen17 > 2,6) [55]

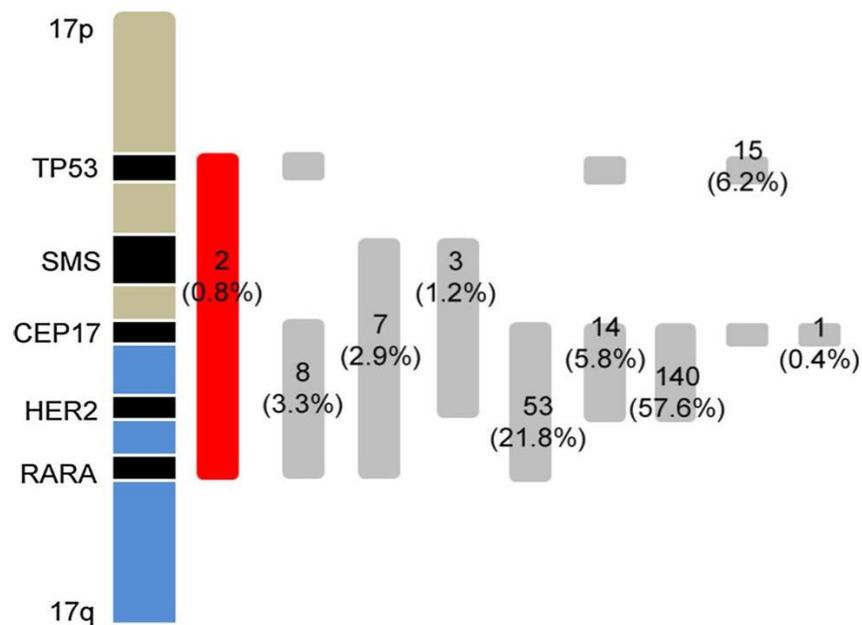


Abbildung 45: Kombinierte Markerzugewinne in 243 Tumoren mit Cen17 > 2,6 [10]

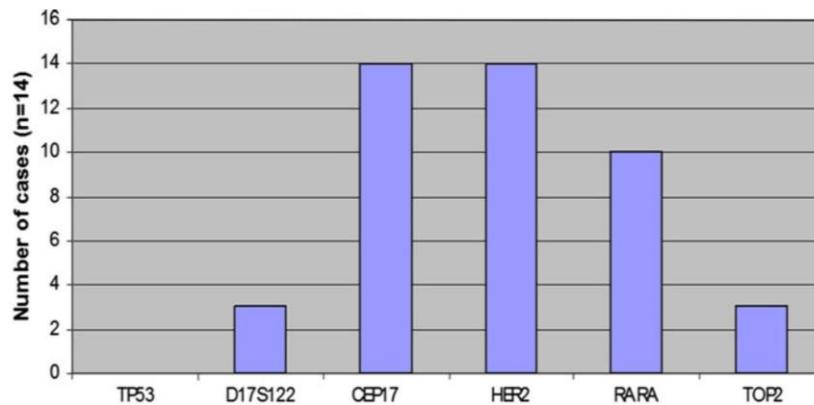


Abbildung 46: Amplifizierte Marker in 14 Brusttumoren [9]

Locus ID	Cytoband	Homozygous deletion (%)	Heterozygous deletion (%)	Diploid (%)	Low-level gain (%)	High-level amplification (%)	Co-amplification with <i>HER2</i> ^a (%)
Four genes in the current study							
<i>HER2</i>	2064	17q12	1 (0.1)	263 (24.4)	483 (44.7)	199 (18.4)	134 (12.4)
<i>RARA</i>	-5535	17q21.2	4 (0.4)	308 (28.5)	492 (45.6)	207 (19.2)	69/134 (51.5)
<i>SMS</i>	10743	17p11.2	7 (0.7)	579 (53.6)	407 (37.7)	79 (7.3)	8 (0.7)
<i>TP53</i>	7157	17p13.1	14 (1.3)	643 (59.5)	368 (34.1)	54 (5.0)	1 (0.1)
Candidate genes ^b							
<i>MIR4522</i>	100616277	17q11.1	3 (0.3)	290 (26.9)	530 (49.1)	226 (20.9)	31 (2.9)
<i>WSB1</i>	26118	17q11.1	3 (0.3)	290 (26.95)	529 (49.0)	227 (21.1)	31 (2.9)
<i>TBC1D3P5</i>	-5462	17q11.1	4 (0.4)	285 (26.4)	529 (49.0)	224 (20.7)	38 (3.5)
<i>RN7SL576P</i>	-5465	17q11.2	2 (0.2)	283 (26.2)	529 (49.0)	226 (20.9)	40 (3.7)
<i>LGALS9</i>	-5464	17q11.2	3 (0.3)	281 (26.0)	528 (48.8)	228 (21.1)	40 (3.7)
<i>NOS2</i>	4843	17q11.2	2 (0.2)	281 (26.0)	527 (48.8)	226 (20.9)	44 (4.1)
<i>LYRM9</i>	201229	17q11.2	2 (0.2)	279 (25.8)	527 (48.8)	227 (21.1)	45 (4.2)
<i>PYY2</i>	23615	17q11.2	2 (0.2)	272 (25.2)	527 (48.8)	236 (21.9)	43 (4.0)
<i>PPY2</i>	23614	17q11.2	3 (0.3)	270 (25.0)	527 (48.8)	237 (21.9)	43 (4.0)
<i>SCARNA20</i>	-5466	17q11.2	2 (0.2)	276 (25.6)	526 (48.7)	233 (21.6)	43 (4.0)
<i>SNORA70</i>	-5467	17q11.2	2 (0.2)	276 (25.6)	526 (48.7)	233 (21.6)	43 (4.0)

<https://confluence.broadinstitute.org/display/GDAC/Dashboard-Analyses>

^a Of the *HER2* amplified cases, the number of cases with amplification in each gene is presented

^b 11 most stable genes on chromosome 17 which can be used as alternative to CEP17

Abbildung 47: Kopienanzahlveränderungen von 1018 Brusttumoren gemäß aCGH-Daten des TCGA-Datensets [10]

4 Verzeichnisse

4.1 Abkürzungen

ASCO/CAP	American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists
BDISH	Bright-field Double-ISH
BRCA1	BReast CAncer 1
Cen17	Zentromer 17
aCGH	Array-based Comparative Genomic Hybridization
CISH	Chromogene-in-situ-Hybridisierung
CIN	Chromosomale Instabilität
CNA	Copy Number Alteration
DDISH	Dual-hapten Dual-color-ISH
DFS	Disease Free Survival
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERBB2/v-erb-b2	avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIC-1	Hypermethylated In Cancer Gene 1
IHC	Immunhistochemie

ISH	In-situ-Hybridisierung
LOH	Loss of Heterozygosity
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NPI	Nottingham Prognostic Index
RAI1	Retinoic Acid Induced 1
RARA	Retinoic Acid Receptor Alpha
SISH	Silber-in-situ-Hybridisierung
SMS	Smith Magenis Syndrom
SSC	Saline Sodium Citrate
TAU	Mikrotubuli-assoziiertes Protein TAU
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Microarray
TOP2A	Topoisomerase 2 Alpha
TP53	Tumorsuppressorgen 53
RDM1	RaD52 Motif 1
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
WNFISH	Whole Nuclei-FISH
17p	kurzer Arm von Chromosom 17
17q	langer Arm von Chromosom 17

4.2 Abbildungen

Abb. 1: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) zur Her2-Diagnostik mit IHC [78].....	13
Abb. 2: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) für Her2-Diagnostik mit Ein-Marker ISH [78].....	14
Abb. 3: ASCO/CAP-Richtlinien (2013) für Her2-Diagnostik mit Zwei-Marker ISH [78].....	14
Abb. 4: Algorithmus für die Bestimmung des Her2-Status bei Polysomie 17 [30].....	16
Abb. 5: Her2-Genkopien in 6 polysomen Tumoren mit Trastuzumab-Antwort [45].....	20
Abb. 6: Korrelation zwischen Cen17-Anzahl, IHC und Antwortrate [30].....	20
Abb. 7: 2 aus 4 Patientenkollektiven.....	27
Abb. 8: 2 aus 4 Patientenkollektiven.....	28
Abb. 9: Markerzugewinne und -verluste aller Kollektive.....	33
Abb. 10: Kombinierte Markerzugewinne des potentiell polysomen Tumorkollektivs.....	35
Abb. 11: Kombinierte Markerzugewinne des nicht-polysomen, nicht-Her2-amplifizierten und des Her2-positiven Tumorkollektivs und des benignen Gewebekollektivs.....	36
Abb. 12: 37/82 "echt" polysome Fälle aus potentiell polysomem Tumorkollektiv.....	37
Abb. 13: 3/78 "echt" polysome Fälle aus Her2-positivem Tumorkollektiv.....	38
Abb. 14: 31/82 Cen17-koamplifizierte Fälle aus potentiell polysomem Tumorkollektiv.....	39
Abb. 15: 15/82 Cen17-koamplifizierte Fälle im potentiell polysomen Tumorkollektiv.....	40
Abb. 16: 15/82 "echt" Cen17-koamplifizierte Fälle des potentiell polysomen Tumorkollektivs.....	40
Abb. 17: 24/78 Cen17-koamplifizierte Fälle im Her2-positiven Tumorkollektiv.....	42
Abb. 18: Berechnung des "Marker-Kombinations-Score".....	44
Abb. 19: Benigne Kontrolle (Stanze E, 18403/06).....	47
Abb. 20: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 33).....	48
Abb. 21: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 34).....	49
Abb. 22: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 18).....	49
Abb. 23: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 60).....	50
Abb. 24: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv und "Kombinations-Score" (Lfd. Nr. 27).....	51

Abb. 25: Cen17-koamplifizierte Probe aus potentiell polysomem Tumorkollektiv (Lfd. Nr. 35).....	51
Abb. 26: Prozentuale Häufigkeit von Chromosomenaberrationen	52
Abb. 27: Zugewinne und Verluste von Spec21, Spec13, Cen17 und Cen18 im potentiell polysomen (rechts) und nicht-polysomen Tumorkollektiv (links)	53
Abb. 28: Markerzugewinne für potentiell polysomes Tumorkollektiv	54
Abb. 29: Her2-Status für potentiell polysomes Tumorkollektiv (ASCO/CAP 2007/2013)	56
Abb. 30: Her2-Status für Her2-positives Tumorkollektiv (ASCO/CAP 2007/2013)	57
Abb. 31: Her2-Status für potentiell polysomes Tumorkollektiv	58
Abb. 32: Her2-Status für Her2-positives Tumorkollektiv	59
Abb. 33: Gene auf Chromosom 17 [5]	73
Abb. 34: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]	74
Abb. 35: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]	75
Abb. 36: ASCO/CAP-Richtlinien 2007/2013 [66]	76
Abb. 37: 17p-Amplifikationen [108]	84
Abb. 38: 17q-Amplifikationen [108]	84
Abb. 39: Cen17-Amplifikationen [108]	85
Abb. 40: Her2/ERBB2-Amplifikationen [108]	85
Abb. 41: Restliche 4/11 CGH-Fälle	86
Abb. 42: Her2-Status von ASCO/CAP 2007 (links) und 2013 (rechts) für potentiell polysomes Tumorkollektiv	87
Abb. 43: Her2-Status von ASCO/CAP 2007 (links) und 2013 (rechts) für Her2-positives Tumorkollektiv	88
Abb. 44: "Echte" Polysomie unter 171 Fällen mit Cen17-Zugewinn ($Cen17 > 2,6$) [55]	89
Abb. 45: Kombinierte Markerzugewinne in 243 Tumoren mit $Cen17 > 2,6$ [10]	89
Abb. 46: Amplifizierte Marker in 14 Brusttumoren [9]	90
Abb. 47: Kopienzahlveränderungen von 1018 Brusttumoren gemäß aCGH-Daten des TCGA- Datensets [10]	90

4.3 Tabellen

Tab. 1: FDA-geprüfte Test-Kits für Her2-Diagnostik [25].....	7
Tab. 2: Richtlinien zur ISH-Her2-Diagnostik von ASCO/CAP (2007/2013) und FDA [76]..	13
Tab. 3: Abhängigkeit des diagnostischen Her2-Status von einer Cen17-Koamplifikation [87].....	25
Tab. 4: Referenzbereiche für Markersignale pro Zellkern.....	33
Tab. 5: 16/82 zweifelhafte Fälle aus dem potentiell polysomen Tumorkollektiv.....	43
Tab. 6: 2/78 zweifelhafte Fälle aus dem Her2-positiven Tumorkollektiv	43
Tab. 7: "Marker-Kombinations-Score" der 16/82 zweifelhaften Fälle des potentiell polysomen Tumorkollektivs.....	45
Tab. 8: "Kombinations-Score" für Lfd. Nr. 60.....	50
Tab. 9: Benignes Gewebekollektiv, 20 Patienten	77
Tab. 10: Nicht-polysomes/nicht-Her2-amplifiziertes Tumorkollektiv, 52 Patienten	79
Tab. 11: Her2-positives Tumorkollektiv, 78 Patienten	81
Tab. 12: Potentiell polysomes Tumorkollektiv, 82 Patienten	83

5 Literatur

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000;321:624–628.
2. Ayad E, Mansy M, Elwi D, Salem M, Salama M, Kayser K. Comparative study between quantitative digital image analysis and fluorescence in situ hybridization of breast cancer equivocal human epidermal growth factor receptors 2 score 2+ cases. *J Pathol Inform* 2015;6:31.
3. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893–2917.
4. Forozan F, Mahlamäki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, et al. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000;60:4519–4525.
5. Zhang W, Yu Y. The important molecular markers on chromosome 17 and their clinical impact in breast cancer. *Int J Mol Sci* 2011;12:5672–5683.
6. Reinholz MM, Bruzek AK, Visscher DW, Lingle WL, Schroeder MJ, Perez EA, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol* 2009;10:267–277.
7. Marchiò C, Lambros MB, Gugliotta P, Di Cantogno LV, Botta C, Pasini B, et al. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 2009;219:16–24.
8. Moelans CB, Weger RA de, van Diest PJ. Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: Analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:1–7.
9. Varga Z, Tubbs RR, Wang Z, Sun Y, Noske A, Kradofer D, et al. Co-amplification of the HER2 gene and chromosome 17 centromere: A potential diagnostic pitfall in HER2 testing in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:925–935.
10. Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Chung YR, Park SY. Assessment of HER2 status in invasive breast cancers with increased centromere 17 copy number. *Breast Cancer Res Treat* 2015;153:67–77.

11. Arriola E, Marchio C, Tan DSP, Drury SC, Lambros MB, Natrajan R, et al. Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab Invest* 2008;88:491–503.
12. Hicks J, Krasnitz A, Lakshmi B, Navin NE, Riggs M, Leibu E, et al. Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res* 2006;16:1465–1479.
13. Natrajan R, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DSP, Marchio C, et al. Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:2711–2722.
14. Wang ZC, Lin M, Wei L-J, Li C, Miron A, Lodeiro G, et al. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res* 2004;64:64–71.
15. Ross J, Fletcher J. The Her2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3:237–252.
16. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989;4:362–366.
17. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1120–1128.
18. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118–145.
19. Van de Vijver M, van de Bersselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the Linked c-erbA oncogene. *Mol Cell Biol* 1987;7:2019–2023.
20. Muller KE, Marotti JD, Memoli VA, Wells WA, Tafe LJ. Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 guideline updates at an academic medical center that performs primary HER2 FISH testing. *Am J Clin Pathol* 2015;144:247–252.
21. Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JMS. HER2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 2014;40:276–284.
22. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, Espinet B, Corzo C, et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of

- 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 2005;7:273.
23. Hubalek M, Brunner C, Matthä K, Marth C. Resistance to HER2-targeted therapy: Mechanisms of trastuzumab resistance and possible strategies to overcome unresponsiveness to treatment. *Wien Med Wochenschr* 2010;160:506–512.
 24. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. Timeline: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:361–370.
 25. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–182.
 26. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: Clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014;27:4–18.
 27. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418–423.
 28. Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, Lasorsa L, Chuchana P, Ursule L, et al. Genomic and expression profiling of chromosome 17 in breast cancer reveals complex patterns of alterations and novel candidate genes. *Cancer Res* 2004;64:6453–6460.
 29. Doherty JK, Bond C, Jardim A, Adelman JP, Clinton GM. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10869–10874.
 30. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmöller P, Gutjahr T, et al. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol* 2008;61:89–94.
 31. Sahoo R, Babu VC, Harini VV, Patil GV, Dhondalay GK, Kulkarni J, et al. Her-2/neu overexpression due to polysomy 17 in breast cancer: molecular testing to guide therapeutic options. *Onkologie* 2011;34:356–360.
 32. Lipkowitz S. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: ubiquitin mediated degradation of growth factor receptors in the pathogenesis and treatment of cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5:8–15.

33. Magnifico A, Albano L, Campaner S, Campiglio M, Pilotti S, Ménard S, et al. Protein kinase Calpha determines HER2 fate in breast carcinoma cells with HER2 protein overexpression without gene amplification. *Cancer Res* 2007;67:5308–5317.
34. Shah SS, Wang Y, Tull J, Zhang S. Effect of high copy number of HER2 associated with polysomy 17 on HER2 protein expression in invasive breast carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2009;18:30–33.
35. Orsaria M, Khelifa S, Buza N, Kamath A, Hui P. Chromosome 17 polysomy: Correlation with histological parameters and HER2NEU gene amplification. *J Clin Pathol* 2013;66:1070–1075.
36. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005;11:4393–4399.
37. Torrisi R, Rotmensz N, Bagnardi V, Viale G, Curto BD, Dell'orto P, et al. HER2 status in early breast cancer: relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17. *Eur J Cancer* 2007;43:2339–2344.
38. Hyun CL, Lee HE, Kim KS, Kim S-W, Kim JH, Choe G, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:317–321.
39. Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 2004;121:70–77.
40. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn* 2003;5:155–159.
41. Vranic S, Teruya B, Repertinger S, Ulmer P, Hagenkord J, Gatalica Z. Assessment of HER2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17. *Cancer* 2011;117:48–53.
42. Fan Y-S, Casas CE, Peng J, Watkins M, Fan L, Chapman J, et al. HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline. *Breast Cancer Res Treat* 2016;155:457–462.
43. Merola R, Mottolise M, Orlandi G, Vico E, Cognetti F, Sperduti I, et al. Analysis of aneusomy level and HER-2 gene copy number and their effect on amplification rate in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. *Eu J Cancer* 2006;42:1501–1506.

44. Vanden Bempt I, van Loo P, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens M-R, et al. Polysomy 17 in breast cancer: Clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol* 2008;26:4869–4874.
45. Ji H, Xuan Q, Nanding A, Zhang H, Zhang Q, Wikman H. The clinicopathologic and prognostic value of altered chromosome 17 centromere copy number in HER2 fish equivocal breast carcinomas. *PLOS ONE* 2015;10:1–11.
46. Sauer T, Beraki K, Jebsen PW, Ormerod E, Naess O. Numerical aberrations of chromosome 17 in interphase cell nuclei of breast carcinoma cells: lack of correlation with abnormal expression of p53, neu and nm23 protein. *APMIS* 1998;106:921–927.
47. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2572–2579.
48. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, Tubbs RR, Skacel M, Grogan T, et al. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1221–1227.
49. Krishnamurti U, Hammers JL, Atem FD, Storto PD, Silverman JF. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:1044–1048.
50. Capelan M, Pugliano L, Azambuja E de, Bozovic I, Saini KS, Sotiriou C, et al. Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2013;24:273–282.
51. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: An institutional-based review. *J Clin Oncol* 2010;28:92–98.
52. Yeh I-T, Martin MA, Robetorye RS, Bolla AR, McCaskill C, Shah RK, et al. Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol* 2009;22:1169–1175.
53. Dekker TJ, Borg ST, Hooijer GK, Meijer SL, Wesseling J, Boers JE, et al. Determining sensitivity and specificity of HER2 testing in breast cancer using a tissue micro-array approach. *Breast Cancer Res* 2012;14:R93.
54. Press MF, Finn RS, Cameron D, Di Leo A, Geyer CE, Villalobos IE, et al. HER-2 gene amplification, HER-2 and epidermal growth factor receptor mRNA and protein

- expression, and lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7861–7870.
55. Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaft PL, Wiley JC, Kussick SJ, et al. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: Implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol* 2011;29:4168–4174.
 56. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, et al. Aneusomy 17 in breast cancer: Its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 2002;15:137–145.
 57. Troxell ML, Bangs CD, Lawce HJ, Galperin IB, Baiyee D, West RB, et al. Evaluation of Her-2/neu status in carcinomas with amplified chromosome 17 centromere locus. *Am J Clin Oncol* 2006;126:709–716.
 58. Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JMS. Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2004;10:4793–4798.
 59. Jiang H, Bai X, Meng F, Zhang C, Zhang X. Evaluation of chromosome 17 polysomy in breast cancer by FISH analysis of whole nuclei, and its clinicopathological significance. *Oncol Lett* 2014:1954–1958.
 60. Bartlett JMS, Campbell FM, Mallon EA. Determination of HER2 amplification by in situ hybridization: When should chromosome 17 also be determined? *Am J Clin Pathol* 2008;130:920–926.
 61. Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Barlett JM. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77:109–114.
 62. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M, Chen B. HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol* 2004;121:631–636.
 63. Gunn S, Yeh I-T, Lytvak I, Tirtorahardjo B, Dzidic N, Zadeh S, et al. Clinical array-based karyotyping of breast cancer with equivocal HER2 status resolves gene copy number and reveals chromosome 17 complexity. *BMC Cancer* 2010;10:396.
 64. Sapino A, Maletta F, Di Verdun Cantogno L, Macri L, Botta C, Gugliotta P, et al. Gene status in HER2 equivocal breast carcinomas: Impact of distinct recommendations and contribution of a polymerase chain reaction-based method. *Oncologist* 2014;19:1118–1126.

65. Stoss OC, Scheel A, Nagelmeier I, Schildhaus H-U, Henkel T, Viale G, et al. Impact of updated HER2 testing guidelines in breast cancer-re-evaluation of HERA trial fluorescence in situ hybridization data. *Mod Pathol* 2015;28:1528–1534.
66. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:3997–4013.
67. Long TH, Lawce H, Durum C, Moore SR, Olson SB, Gatter K, et al. The new equivocal. *Am J Clin Pathol* 2015;144:253–262.
68. Swanson PE, Yang H. Is 'polysomy' in breast carcinoma the 'new equivocal' in HER2 testing? *Am J Clin Pathol* 2015;144:181–184.
69. Minot DM, Voss J, Rademacher S, Lwin T, Orsulak J, Caron B, et al. Image analysis of HER2 immunohistochemical staining. *Am J Clin Pathol* 2012;137:270–276.
70. Geiersbach KB, Willmore-Payne C, Pasi AV, Paxton CN, Werner TL, Xu X, et al. Genomic Copy Number Analysis of HER2-Equivocal Breast Cancers. *Am J Clin Pathol* 2016;146:439–447.
71. Gaiser T, Rüschoff J, Moll R. In-situ-Hybridisierung in der klinischen Pathologie. *Pathologe* 2012;33:307–310.
72. Murthy SS, Sandhya DG, Ahmed F, Goud KI, Dayal M, Suseela K, et al. Assessment of HER2/Neu status by fluorescence in situ hybridization in immunohistochemistry-equivocal cases of invasive ductal carcinoma and aberrant signal patterns: A study at a tertiary cancer center. *Indian J Pathol Microbiol* 2011;54:532–538.
73. Lü YL, Zhong M, Liu L, Wei LX, Zhao P. [Clinicopathologic significance of chromosome 17 polysomy in breast cancer] (Article in Chinese). *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2008;37:88–91.
74. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Egawa C, Kasugai T, Takami S, Inazawa J, et al. Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer* 2001;93:165–170.
75. Takehisa M, Sasa M, Bando Y, Hirose T, Morimoto T, Nagao T, et al. Chromosomal aneusomy (chr 1, 11, 17) detected by fluorescence in situ hybridization may be a prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res* 2007;27:1073–1078.
76. Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W, Azambuja E de, Dafni U, Rueschoff J, et al. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated

- with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: The HERA trial. *J Clin Oncol* 2009;27:2962–2969.
77. Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, et al. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol* 2010;28:4307–4315.
 78. Kaufman PA, Broadwater G, Lezon-Geyda K, Dressler LG, Berry D, Friedman P, et al. CALGB 150002: Correlation of HER2 and chromosome 17 (ch17) copy number with trastuzumab (T) efficacy in CALGB 9840, paclitaxel (P) with or without T in HER2+ and HER2- metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 2007;25:1009.
 79. Seidman AD, Berry D, Cirrincione C, Harris L, Muss H, Marcom PK, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of cancer and leukemia group B protocol 9840. *J Clin Oncol* 2008;26:1642–1649.
 80. Downey L, Livingston RB, Koehler M, Arbushites M, Williams L, Santiago A, et al. Chromosome 17 polysomy without human epidermal growth factor receptor 2 amplification does not predict response to lapatinib plus paclitaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1281–1288.
 81. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, et al. Predictive markers of anthracycline benefit: A prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol* 2010;11:266–274.
 82. Orlando L, Del Curto B, Gandini S, Ghisini R, Pietri E, Torrisi R, et al. Topoisomerase II α gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. *Breast* 2008;17:506–511.
 83. Bartlett JM, McConkey CC, Munro AF, Desmedt C, Dunn JA, Larsimont DP, et al. Predicting anthracycline benefit: TOP2A and CEP17-not only but also. *J Clin Oncol* 2015;33:1680–1687.
 84. Bartlett JM, Desmedt C, Munro A, O'Malley FP, Larsimont D, Di Leo A, et al. Chromosome 17 polysomy: A unifying hypothesis underlying benefit from adjuvant anthracyclines? *Cancer Res* 2009;69:6059.
 85. Petroni S, Addati T, Mattioli E, Caponio MA, Quero C, Rubini V, et al. Centromere 17 copy number alteration: Negative prognostic factor in invasive breast cancer? *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:993–1000.

86. Moelans CB, van Diest PJ. CEP17 copy number increase does not indicate polysomy 17. *J Clin Pathol* 2014;67:454–455.
87. Holzschuh M-A, Czyz Z, Hauke S, Inwald EC, Polzer B, Brockhoff G. HER2 FISH results in breast cancers with increased CEN17 signals using alternative chromosome 17 probes - reclassifying cases in the equivocal category. *Histopathology* 2017;71:610-625.
88. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010;463:899–905.
89. Qian X-L, Wen HY, Yang Y-L, Gu F, Guo X-J, Liu F-F, et al. Assessment of dual-probe Her-2 fluorescent in situ hybridization in breast cancer by the 2013 ASCO/CAP guidelines produces more equivocal results than that by the 2007 ASCO/CAP guidelines. *Breast Cancer Res Treat* 2016;159:31–39.
90. Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, et al. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008;10:R2.
91. Brockhoff G, Bock M, Zeman F, Hauke S. The FlexISH assay brings flexibility to the cytogenetic HER2 testing. *Histopathology* 2016;69:635-646.
92. Weise A, Mrasek K, Kosyakova N, Mkrtychyan H, Gross M, Klaschka Vivien. ISH probes derived from BACs, including microwave treatment for better FISH results. In: Liehr T (Hg). *Fluorescence in situ hybridization (FISH) - application guide*. Berlin/Heidelberg 2009:53–60.
93. Brockhoff G, Holzschuh MA, Inwald EC, Polzer B, Czyz Z, Hauke S. Cytogenetic HER2 testing with 17p- and 17q-located hybridization markers facilitates the accurate discrimination of true vs. false polysomy and might dissect the 'equivocals';(unveröffentlichtes Manuskript).
94. https://genetik.charite.de/diagnostik/array_cgh/ (Stand: 20.09.2017, 16:00 Uhr).
95. Gliem T, Flynn H, Jenkins R. An evaluation of specimens with amplified centromere 17 signals in the setting of fluorescent in situ (FISH) HER2 testing in breast cancer. *J Assoc Genet Technologists* 2005:110.
96. Park K, Kim J, Lim S, Han S. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39:631–634.

97. Saito M, Kato Y, Ito E, Fujimoto J, Ishikawa K, Doi A, et al. Expression screening of 17q12-21 amplicon reveals GRB7 as an ERBB2-dependent oncogene. *FEBS letters* 2012;586:1708–1714.
98. Bai T, Luoh S-W. GRB-7 facilitates HER-2/Neu-mediated signal transduction and tumor formation. *Carcinogenesis* 2008;29:473–479.
99. Nencioni A, Cea M, Garuti A, Passalacqua M, Raffaghello L, Soncini D, et al. Grb7 upregulation is a molecular adaptation to HER2 signaling inhibition due to removal of Akt-mediated gene repression. *PLOS ONE* 2010;5:e9024.
100. Zhang Y, Martens JWM, Yu JX, Jiang J, Sieuwerts AM, Smid M, et al. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:3795–3801.
101. Koudelakova V, Trojanec R, Vrbkova J, Donevska S, Bouchalova K, Kolar Z, et al. Frequency of chromosome 17 polysomy in relation to CEP17 copy number in a large breast cancer cohort. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55:409–417.
102. Ping Z, Siegal GP, Almeida JS, Schnitt SJ, Shen D. Mining genome sequencing data to identify the genomic features linked to breast cancer histopathology. *J Path Informatics* 2014;5:3.
103. Kasiappan R, Shih H-J, Chu K-L, Chen W-T, Liu H-P, Huang S-F, et al. Loss of p53 and MCT-1 overexpression synergistically promote chromosome instability and tumorigenicity. *Mol Cancer Res* 2009;7:536–548.
104. Dubourg C, Bonnet-Brilhault F, Toutain A, Mignot C, Jacquette A, Dieux A, et al. Identification of nine new RAI1-truncating mutations in Smith-Magenis Syndrome patients without 17p11.2 deletions. *Mol Syndromol* 2014;5:57–64.
105. Pu X, Shi J, Li Z, Feng A, Ye Q. Comparison of the 2007 and 2013 ASCO/CAP evaluation systems for HER2 amplification in breast cancer. *Pathol Res Pract* 2015;211:421–425.
106. Bethune GC, van Veldhuijzen Zanten D, MacIntosh RF, Rayson D, Younis T, Thompson K, et al. Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: A focus on tumours assessed as ‘equivocal’ for HE. *Histopathology* 2015;67:880–887.
107. Mansfield AS, Sukov WR, Eckel-Passow JE, Sakai Y, Walsh FJ, Lonzo M, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and dual-ISH (DISH) in the determination of HER2 status in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2013;139:144–150.

108.http://www.broadinstitute.org/tumorscape/textReader/IGV/breast_session.xml

(Stand: 20.09.2017, 16:10 Uhr).

6 Danksagung

Mein Dank gilt

Marietta Bock, Zbigniew Czyz, Dr. Bernhard Polzer, Dr. Sven Hauke,

PD Dr. Andreas Gaumann

und insbesondere Prof. Dr. Gero Brockhoff.

7 Lebenslauf

Maria-Anna Holzschuh

Persönliche Daten

Name: Maria-Anna Guadalupe Holzschuh
 Geburtsdatum: 19.06.1994
 Geburtsort: Penzberg / Oberbayern

Ausbildung

Grundschule:	2001 - 2004	Grundschule, Diesenbach
Gymnasium:	2004 - 2012	Johann-Michael-Fischer-Gymnasium, Burglengenfeld
Schulabschluss:	06/2012	Abitur
Studium:	10/2012 - 06/2019	Humanmedizin, Universität Regensburg
Stipendium:	10/2012 - 06/2019	Stipendiatin, Max Weber-Programm
Famulaturen:	03/2015	Hausarztpraxis Dr. Welzenbach, Würzburg
	02/2016	Gynäkologie und Geburtshilfe, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
	09/2016	Kinder- und Jugendpsychiatrie, Bezirkskrankenhaus, Regensburg
	03/2017	Psychiatrie, Schlosspark-Klinik, Berlin

Praktisches Jahr:	05/2018 - 08/2019	Psychiatrie, St. Hedwig-Krankenhaus, Berlin
	09/2018 - 12/2019	Innere Medizin, Schlosspark-Klinik, Berlin
	01/2019 - 04/2019	Chirurgie, St. Joseph Krankenhaus, Berlin
Ärztliche Prüfung:	06. Juni 2019	
Approbation als Ärztin:	04. Juli 2019	