

Sören Eric Huwendiek
Dr. med.

**Charakterisierung von Mammakarzinomen anhand genomischer Instabilität:
Untersuchungen der DNA-Ploidie, Cyclin E- und A-Expression, zentrosomalen
Veränderungen und deren klinische Relevanz**

Geboren am 20.02.1974 in Mannheim

Reifeprüfung am 18.05.1993 in Bruchsal

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis WS 2001/2002

Physikum am 12.09.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium: Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg
Karolinska Institut (Stockholm, Schweden)

Praktisches Jahr: Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg
Harvard Medical School (Boston, USA)
Maastricht University (Maastricht, Niederlanden)

Staatsexamen am 05.12.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. N. E. Fusenig

Basierend auf eine Untersuchung von 154 Mammakarzinomen mit statischer DNA-Zytometrie wurde eine neue Klassifikation von DNA-Profilen anhand des Stammlinien-Streuungs-Index (SSI) beschrieben. Der SSI wurde definiert als die Summe des Prozentsatzes der Zellen in der S-Phase, plus dem Prozentsatz der Zellen mit DNA-Gehalt-Werten welche zweimal den modalen Wert (c-Gehalt der Stammlinie) plus 1c überschreiten (G₂-Exc), plus dem Variationskoeffizient (TumCV) der entsprechenden Tumor-Stammlinie (SSI = S-Phase + G₂-Exc + TumCV). Er ist ein Maß klonaler Heterogenität der DNA-Verteilung in Tumorzellen und hiermit ein Indikator genomischer Instabilität. Die Kalkulation des Grenzwerts des SSI bei 8,8 % (p=0,03) ermöglichte es, Mammatumoren in genomisch stabile (SSI ≤ 8,8 %, gs) und genomisch instabile (SSI > 8,8 %, gu) einzuteilen.

Realtime quantitative RT-PCR-Messungen (qPCR) von Cyclin A- und E-mRNA und immun-histochemische Bestimmung der Cyclin A-Proteinexpression zeigten statistisch signifikant erhöhte Werte in genomisch instabilen Tumoren (SSI > 8,8 %) im Vergleich zu genomisch stabilen Tumoren (SSI ≤ 8,8 %).

In einer Pilot-Studie zeigten aneuploide (A) Mammakarzinome mit einem hohen SSI (SSI > 8,8 %, n=4) einen hohen Prozentsatz (9,6 % ± 2,2) an Zellen mit zentrosomalen Abweichungen, während aneuploide und diploide (D) Karzinome mit jeweils niedrigem SSI (SSI ≤ 8,8 %, jeweils n=3) einen geringen Prozentsatz (Ags: 2,4 % ± 0,6; Dgs: 2,6 % ± 1,2) zentrosomaler Abweichungen vorwiesen.

Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß an Zentrosomenveränderungen und der Menge Cyclin E-mRNA (r= 0,83, p<0,01), Cyclin A-mRNA (r= 0,75, p<0,01) und Cyclin A-Protein (r=0,77, p<0,01) gefunden.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich die anhand der DNA-Gehalt-Streuung (SSI) vorgenommene Einteilung in genomisch stabile und instabile Tumoren auch in signifikant unterschiedlicher Cyclin A- und Cyclin E-Expression und signifikant verschiedenem Ausmaß an Zentrosomenveränderungen widerspiegelt.

Erste Daten zum klinischen Verlauf (Beobachtungsintervall: 2-3 Jahre, durchschnittlich 2 5/12 Jahre) zeigen, dass Patienten in der Gruppe mit einem SSI > 8,8 % eine schlechtere

Prognose besitzen als solche mit einem SSI $\leq 8,8$ % (SSI $> 8,8$ %: 25,6 % Tod durch Mammakarzinom, 18,6 % Fernmetastasen; SSI $\leq 8,8$ %: 2 % Tod durch Mammakarzinom, 4 % Fernmetastasen). Eine Verlaufsstudie von 890 Mammakarzinomen mit einem Beobachtungszeitraum von 9 Jahren bestätigte die prognostische Aussagekraft des SSI. Die durchgeführten Untersuchungen legen nahe, dass der SSI, als Indikator für genomische Instabilität, die Unterteilung der bekannten DNA-Histogrammtypen aneuploid, diploid und tetraploid in niedrig und hoch maligne Subtypen ermöglicht. Die Resultate dieser Arbeit könnten eine Grundlage zur weiteren Optimierung des prognostischen Wertes der Ploidie-Analyse in Mammakarzinomen darstellen.

In Studie 2 wurden 58 durch Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) gewonnene Zellsaspirate anhand eines Antikörpers gegen γ -Tubulin hinsichtlich Zentrosomenveränderungen und anhand statischer DNA-Zytometrie (SSI) hinsichtlich genomischer Instabilität untersucht. Benigne Brustläsionen (n=18) zeigten keine Zentrosomenveränderungen und hatten ein diploides genomisch stabiles DNA-Profil. Genomisch stabile (SSI $\leq 8,8$ %) DNA-diploide Mammakarzinome (n=12) zeigten einen geringen Anteil an Zellen mit veränderten Zentrosomen (2,1 % $\pm 0,26$). Die Gruppe der aneuploiden invasiven Mammakarzinome (n=19) konnte sowohl anhand des signifikant verschiedenen Anteils an Zellen mit Zentrosomenveränderungen (Ags: 1,96 % $\pm 0,26$, n=7 bzw. Agu: 10,3 % $\pm 1,66$, n= 14) als auch anhand des SSI in die aus Studie 1 bekannten signifikant verschiedenen Ploidie-Subtypen aneuploid genomisch stabil (Ags) und aneuploid genomisch instabil (Agu) unterteilt werden (jeweils p=0,0003). Der Prozentsatz an Zellen mit Zentrosomenveränderungen zeigte eine signifikante positive lineare Korrelation mit dem entsprechenden SSI (r=0,82, p<0,0001) und dem Verlust der Zelldifferenzierung (r=0,78, p<0,0001). Das Auftreten von Zentrosomenveränderungen in *in situ* Brustläsionen (DCIS, n=7), weist darauf hin, dass Zentrosomenveränderungen ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellen. Mit nur einem Parameter, dem Prozentsatz an Zellen mit zentrosomalen Abweichungen, konnten die untersuchten Mammatumoren in drei signifikant verschiedene Gruppen unterteilt werden: benigne Läsionen (keine Zentrosomenveränderungen) und zwei maligne Untergruppen unterschiedlicher genomischer Stabilität (Dgs und Ags: 2,1 % $\pm 0,26$ bzw. Agu und Agu DCIS: 9,6 % $\pm 1,82$). Diese Ergebnisse zeigen, dass Zentrosomenveränderungen mit genomischer Instabilität, charakterisiert durch den SSI, und dem Verlust der Gewebedifferenzierung korrelieren und ursächlich an der Tumorentstehung und Tumorprogression beteiligt sein könnten. Weiterhin demonstriert die vorliegende Studie die Machbarkeit von Zentrosomenanalysen in FNAB der Brust und stellt den möglichen diagnostischen und prognostischen Wert dieser Untersuchung in Aussicht.