

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink

Numerische Chromosomen-Aberrationen im
Carcinoma ductale in situ der Mamma
unter besonderer Berücksichtigung
neuerer Klassifikationen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

Vorgelegt von

Christian Kieslich
aus Cottbus

Würzburg, Dezember 2000

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Müller

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Caffier

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 2001

Der Promovend ist Arzt.

Quidquid agis, libenter agas et respice finem !

(römisches Sprichwort)

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	6
2.1. Untersuchtes Patientenmaterial	6
2.2. Aufarbeitung der Gewebeproben	6
2.3. DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	7
2.3.1. Adaptation der DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung an das untersuchte Gewebe	7
2.3.2. Protokoll der DNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	8
2.4. Immunhistochemie	10
2.4.1. Protokoll der Immunhistochemie	10
2.5. Kontrollen	11
2.6. Auswertungskriterien	12
2.7. Statistische Auswertung	13
2.8. Erfassung klinischer Daten	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Pathologische Begutachtung	14
3.2. Zytogenetische Analyse	14
3.3. Klassifikationsparameter und deren Korrelation mit der zytogenetischen Analyse	17
3.4. Tumoren mit heterogener Histopathologie	19
3.5. Auswertung der immunhistochemischen Bestimmung von p53 und MIB	20
3.6. Klinische Befunde	20
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	31
6. Literaturverzeichnis	32
7. Anhang	38

1. Einleitung

Epidemiologische Studien der vergangenen Jahre bestätigen eine ansteigende Inzidenz des Mamma-Karzinoms der Frau. In den vergangenen vierzig Jahren hat sich in den Vereinigten Staaten die Inzidenz des Mamma-Karzinoms nahezu verdoppelt, wobei aber die Mortalitätsrate vergleichsweise stabil blieb^{1,2}. Es wird davon ausgegangen, daß in den westlichen Industrienationen, wo das Mamma-Karzinom die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau darstellt^{3,4}, jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens mit der Entwicklung einer bösartigen Mamma-Geschwulst rechnen muß⁵. Bedingt durch die steigende Inzidenz einerseits und den verstärkten Einsatz der Mammographie als Vorsorgemaßnahme andererseits, kommt es auch zu einem Anstieg der frühen intraduktalen Neoplasien der Mamma im Untersuchungsgut des Pathologen⁶.

Unter einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) der Mamma werden heute all jene Karzinome zusammengefaßt, die in allen Bereichen ihrer Ausdehnung streng intraduktal, das heißt auf die Milchgänge beschränkt, wachsen und keine Invasion in das umliegende Mamma-Stroma zeigen. Entscheidendes Kriterium hierfür ist das Vorhandensein einer intakten Basalmembran des Milchganges⁷. Der Versuch, die biologische und morphologische Heterogenität dieser Erkrankung diagnostischen Entitäten zuzuordnen, hat zur Entwicklung zahlreicher Klassifikationssysteme geführt. Als Kriterien zur Klassifizierung wurden zunächst die verschiedenen Wuchsformen dieses Carcinoma in situ herangezogen. Sie werden den Subtypen Comedo, Clinging, kribriiformes, papilläres und apokrines DCIS zugeordnet. Des weiteren dienen Kern-Atypiegrad und das Vorhandensein von intraduktalen Nekrosen als Klassifikationsparameter⁸. Azzopardi, der sich an der mannigfaltigen Histoarchitektur des duktalem Carcinoma in situ orientierte, schlug eine Einteilung gemäß der fünf histologischen Typen vor⁹. Patchevsky und dessen Mitarbeiter unterteilten die intraduktalen Karzinome aufgrund ihrer Eigenheit der Nekrosenbildung. Es wurden Karzinome unabhängig vom Wachstumsmuster mit ausgedehnten zentralen Gruppennekrosen als sogenannte Comedo-Karzinome von solchen mit vereinzelt Nekrosen als Non-Comedo-Karzinome differenziert¹⁰. Millis und Thynne waren jedoch bei ihren Untersuchungen übereingekommen, Karzinome von kribriiformen und

mikropapillären Typ aus der Gruppe der Comedo-Karzinome auszuschließen¹¹. Bellamy fand in seinen Untersuchungen allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf und dem Vorhandensein von Nekrosen als einzigem pathohistologischen Kriterium nach¹². Diese Heterogenität der Klassifikation und die mangelnde klinische Relevanz veranlaßten Lagios 1989 zu einer revidierten Ausrichtung der Klassifikation. Er unterteilte sein Kollektiv in DCIS von hohem und niedrigem Malignitätsgrad. Seine Analysen zeigten, daß die Progression des intraduktalen Karzinoms weniger mit der Histoarchitektur, als vielmehr mit der Kombination aus hoher Kern-Atypie und dem Auftreten von Nekrosen korrelierte¹³. Weitere Klassifikationssysteme folgten, die unter Beachtung obiger Kriterien das System von Lagios von einem zweistufigen in ein dreistufiges System erweiterten^{14,15,16,17}.

Silverstein stellte schließlich 1996 mit dem Van Nuys Prognostic Index (VNPI) einen Einteilungsmodus vor, der versucht, als Prognoseindex die Erfassung pathologischer Entitäten direkt mit dem klinischen Vorgehen zu kombinieren. Bei 333 Patienten mit DCIS, die über einen Zeitraum von im Mittel 79 Monaten nach Therapieende beobachtet worden waren, zeigte er die zentrale Bedeutung des Kerngradings innerhalb seines Systems, welches nach eigens hierfür definierten Kriterien ausgeführt wird. Das Vorhandensein von Nekrosen und die Größe des Tumors gehen mit geringerem Gewicht ebenfalls in die Bewertung ein. Zusätzlich wird die Distanz des Tumors zur Resektatgrenze als therapiespezifische Variable erfaßt. Es resultiert ein numerischer Score von 3 bis 9, mit dessen Hilfe das relative Risiko eines Rezidivs abgeschätzt werden soll¹⁸.

Die Diagnose intraduktales Karzinom ist deshalb von entscheidender Relevanz für das weitere therapeutische Vorgehen, weil Tumorareale, die nicht sicher chirurgisch entfernt wurden, in ein invasives Karzinom übergehen können, das seinerseits die Fähigkeit zur Metastasierung besitzt^{19,20}. Für den Vorgang der Gewebsinvasion und der damit verbundenen Metastasierungsfähigkeit sind nach heutigem Kenntnisstand spezifische Mutationen des Tumorgenoms vonnöten, die diesem Ereignis vorausgehen müssen²¹. Modellhaft zeigten Fearon und Vogelstein dies am Beispiel der Adenom-

Karzinom-Sequenz beim Dickdarm-Karzinom. Es gelang ihnen hierbei, einzelne genetische Veränderungen während des Ablaufs der kolorektalen Karzinogenese nachzuweisen²². Da das duktales Carcinoma in situ der Mamma aufgrund seines biologischen Verhaltens möglicherweise ein Bindeglied zwischen den benignen proliferierenden Erkrankungen des Drüsenepithels der Mamma und dem invasiven Mamma-Karzinom darstellt, kann es als ein geeignetes Modell fungieren, um genetische Veränderungen im Verlauf der Karzinogenese der Brustdrüse zu studieren.

In den vergangenen 15 Jahren charakterisierten zahlreiche Arbeitsgruppen die Karyotypen von invasiven Mamma-Karzinomen mittels Metaphasen-Präparation und Chromosomen-Banding²³⁻²⁸. Hierbei ließen sich jedoch keine spezifischen Alterationen des Tumorgenoms oder gar eine der Philadelphia-Translokation bei der chronisch myeloischen Leukämie vergleichbare Veränderung finden. So konnten nur die Chromosomen des Genoms angegeben werden, an denen sich bevorzugt zytogenetische Veränderungen manifestierten²⁹. Hiervon war das Chromosom 1 mit seinen Rearrangements am häufigsten betroffen³⁰⁻³³. Interessanterweise wurden innerhalb dieser Studien auch bei benignen proliferierenden Erkrankungen der Mamma auffällige Veränderungen des Chromosomensatzes beschrieben, so daß man davon ausging, daß bereits weit vor der Entwicklung eines invasiven Karzinoms aus einer möglicherweise ursprünglich benignen Läsion weitgreifendere Genom-Mutationen stattgefunden haben²¹. Unter den festgestellten Chromosomenalterationen nehmen jedoch die numerischen Aberrationen eine besondere Stellung ein. So gelang es bislang nicht, den Verlust eines Chromosoms, eine Monosomie, als einzige Veränderung des Genoms eines Mamma-Karzinoms nachweisen²⁹. Andererseits fanden sich für die Chromosomen 1, 7, 8, 18 und 20 gehäuft Trisomien, die sowohl isoliert als auch im Rahmen komplexer Mutationen des Chromosomensatzes auftraten³⁴⁻³⁶.

Der Nachteil vieler genetischer Analysetechniken liegt zum einen in der relativ großen Menge an benötigtem Gewebe. Aufgrund seiner histologischen Heterogenität und der geringen Tumorgroße des DCIS lassen sich solche Untersuchungen an diesen Neoplasien nur bedingt durchführen und erlauben ebenfalls nicht die separate Beurteilung unterschiedlicher Bereiche desselben Tumors. Weiterhin führt die Kurzzeit-

Kultur insbesondere bei niedrig proliferierendem Gewebe zur Selektion irrelevanter Klone²⁹. Für die Analyse des duktales Carcinoma in situ stellt deshalb die Etablierung zahlreicher *in-situ*-Techniken eine große Bereicherung dar, da hiermit sowohl der morphologischen als auch genetischen Vielfalt des DCIS Rechnung getragen werden kann. Die DNA-*in situ*-Hybridisierung an Paraffin-Schnitten hat sich schon in der Vergangenheit als geeignete Methode erwiesen, um numerische Chromosomen-Aberrationen am duktales Carcinoma in situ der Mamma zu untersuchen, wobei sich ebenfalls die bei invasiven Mamma-Karzinomen gefundenen chromosomalen Trisomien nachweisen ließen³⁷⁻⁴¹.

In der vorliegenden Arbeit sollen die einzelnen histologischen Klassifikationskriterien des duktales Carcinoma in situ der Mamma auf eine mögliche Beziehung zu numerischen Chromosomen-Aberrationen hin untersucht werden und damit ihre Bedeutung durch assoziierte genetische Veränderungen untermauert werden. Hierbei soll insbesondere der pathohistologischen Heterogenität dieser Neoplasie Rechnung getragen werden und solche Areale gesonderten Analysen zugeführt werden. Die Einbeziehung von intraduktalen Karzinomen mit mikroinvasiven Herden soll im Hinblick auf die mögliche Tumorprogression zum invasiven Mamma-Karzinom von besonderem Interesse sein. Auch sollen Fälle von atypischer duktales Hyperplasie, atypischer lobulärer Hyperplasie und lobuläre Carcinomata in situ mitausgewählt werden, da diesen proliferativen Erkrankungen der Mamma gemeinsam ist, daß sie unter gewissen Voraussetzungen ein gesteigertes Risiko für die Entstehung eines invasiven Mamma-Karzinoms anzeigen können⁴²⁻⁴⁴. Zur genetischen Analyse sollen Paraffin-Schnitte einer DNA-*in situ*-Hybridisierung unterzogen werden, wobei der Hellfeld-Technik der Vorzug gegeben wird, um einen optimalen Gewebeerhalt zu erzielen und gleichzeitig eine histologische Untersuchung durchführen zu können. Es sollen Sonden für die Chromosomen 1, 7, 8, 18 und 20 eingesetzt werden, deren Bedeutung innerhalb der Zytogenetik des Mamma-Karzinoms bereits weiter oben aufgezeigt wurde. Zusätzlich soll die Proliferationsaktivität der Läsionen anhand des immunhistochemischen Nachweises des Ki-67 Antigens mittels des Paraffin gängigen MIB-1-Antikörpers und die Überexpression des Tumorsuppressorgen-Produktes p53 immunhistochemische dargestellt werden und als molekularbiologische Marker mit den

zytogenetischen Ergebnissen korreliert werden. Sowohl eine erhöhte Proliferationsaktivität als auch die verstärkte Expression des p53 Genes gehen unabhängig voneinander mit einer Abnahme des rezidivfreien Intervalls nach chirurgischer Intervention als auch mit einer erhöhten Tumor bedingten Mortalität einher, wie es die Arbeitsgruppen um Seshadri ⁴⁵ und Kreipe ⁴⁶ für invasive Mamma-Karzinome belegen konnten.

Vorläufige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden von der American Society for Investigative Pathology als Graduate Student Research Highlight ausgewählt und während des Kongresses Experimental Biology 1998 in San Francisco vorgestellt.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchtes Patientenmaterial

Zur Prüfung auf numerische Chromosomen-Aberrationen wurde routinemäßig mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Mamma-Gewebe verwendet. Es handelte sich einerseits um Probeexzisionen, die unter klinischem Tumor-Verdacht entnommen wurden, andererseits um Material aus Ablationen der Mamma, die im Rahmen der chirurgischen Tumor-Therapie vorgenommen wurden. Zur pathohistologischen Untersuchung wurden je nach Fall zwischen 5 und 20 Blöcke lichtmikroskopiert. Insgesamt wurden 35 Läsionen ausgewählt, die bei 30 Patientinnen gefunden wurden.

2.2. Aufarbeitung der Gewebe-Proben

Von den archivierten Paraffin-Blöcken wurden auf einem Schlittenmikrotom 3-4 µm dicke Schnitten angefertigt, auf mit APES (2-Aminopropyltriethoxy-Silan) beschichtete Objektträger aufgezogen, zunächst für eine halbe Stunde im Wärmeschrank bei 56 °C und anschließend bei 37 °C über Nacht getrocknet. Dies sollte eine Ablösung der Schnitte während der teilweise sehr aggressiven Behandlungsschritte der *In situ*-Hybridisierung verhindern.

Zunächst wurden pro Block 20 Serien-Schnitte angefertigt, wobei jeder zehnte Schnitt mit Hämalaun-Eosin gefärbt wurde, um zu kontrollieren, ob noch ausreichend Material der zu untersuchenden Läsion verblieben war.

Zur Beschichtung mit APES wurden die Objektträger für jeweils 30 Sekunden in 2% APES in Aceton und zwei Portionen reines Aceton getaucht, danach über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

2.3. DNA-*in situ*-Hybridisierung

2.3.1. Adaptation der DNA-*in situ*-Hybridisierung an das untersuchte Gewebe

Die *In situ*-Hybridisierung, die nach der von Hopman angegebenen Methode durchgeführt wurde ⁴⁷, umfaßt mehrere Behandlungsschritte, die individuell an das untersuchte Mamma-Gewebe angepaßt werden mußten, um eine Optimierung des Ergebnisses zu erzielen.

Zunächst wurden unterschiedliche Zeiten für die Natriumthiocyanat-Behandlung und den Pepsin-Andau getestet. Durch diesen Schritt konnte eine Steigerung der Signalintensität erzielt werden, was jedoch mit einer Schädigung des Gewebeerhaltes einherging. Jede Gewebeprobe wurde zunächst mit einer Chromosomenprobe hybridisiert, bei der jeweils drei Schnitte unterschiedlich lange angehaut wurden. Die Zeit des besten Ergebnisses wurde im folgenden für die weiteren Proben verwandt.

Des weiteren mußte die Salzkonzentration der Waschlösung und die dafür vorgesehene Zeit und Temperatur angepaßt werden. Die Waschzeit mußte für die verschiedenen Sonden variiert werden. Das Formamid, welches im Protokoll in der ersten Waschlösung enthalten war, wurde weggelassen, da durch diesen Zusatz die Sonden-DNA vollständig aus dem Gewebe entfernt wurde.

Bezugsquellen der Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen können dem Anhang entnommen werden.

2.3.2. Protokoll der DNA-*in situ*-Hybridisierung

1. Vorbehandlung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 3 x 7 min.
- Spülen in absolutem Alkohol 2 x

2. Blockierung endogener Peroxidasen

- Spülen in absolutem Methanol 2 x
- Inkubieren in 1% H₂O₂ in absolutem Methanol 30 min.
- Spülen in absolutem Methanol 2 x
- Trocknen der Schnitte unter dem Abzug 15 min.

3. Permeabilisierung

- Inkubieren in 1 mol NaSCN-Lösung bei 80°C im Wasserbad für 3, 4 oder 5 min.
- Spülen in Aqua bidest. 3 x
- Inkubieren in Pepsin-Lösung für 6, 8 oder 10 min.
- Spülen in Aqua bidest. 3 x
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- Lufttrocknen unter dem Abzug 15 min.

4. Denaturierung und Hybridisierung

- Mischen von jeweils 1 µl Sonde mit 10 µl Hybrisol pro Präparat
- Auftragen der Hybridisierungslösung
- Auflegen eines Deckglases (18 x 18 mm)
- Umranden des Deckglases mit Fixogum Rubber-Cement zum luftdichten Abschluß
- Denaturierung in einer Blechwanne im Wasserbad bei 80°C für 5 min.
- Hybridisieren bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht

5. Waschung

- Lösen des Fixogumfilms mit der Pinzette
- Abschwimmenlassen der Deckgläser in einer Küvette mit PBS (Phosphat-gepufferte Salz-Lösung)
- Waschen in 0,8 x SSC bei 72°C :
 - für Chromosomen-Probe 7 : 4 x 7 min.
 - für Chromosomen-Proben 8 und 18 : 3 x 7 min.
 - für Chromosomen-Probe 1p36 : 1 x 7 min.
- Sammeln der Objektträger in PBS

6. Detektion

- Absättigen des Gewebes mit Rinderserum-Albumin-Lösung (BSA) 100 µl pro Objektträger für 20 min.
- Abkippen (nicht abspülen !) der BSA-Lösung
- Inkubieren mit dem Primär-Antikörper (Originallösung 1:10 verdünnt mit PBS) 100 µl pro Objektträger für 90 min.
- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren mit dem Sekundär-Antikörper (Originallösung 1:20 verdünnt mit BSA-Lösung) 100 µl pro Objektträger für 60 min.
- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren mit dem Tertiär-Antikörper (Originallösung 1:50 verdünnt mit BSA-Lösung) 100 µl pro Objektträger für 60 min.

7. Signalentwicklung

- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren in Diaminobenzidin-Lösung (DAB) 200 µl pro Objektträger für 3-4 min.
- Spülen in Leitungswasser zum Unterbrechen der Enzymreaktion
- Spülen in Aqua dest.
- Eintauchen in Hämalun-Lösung 3 x kurz
- Spülen in Aqua dest.
- Bläuen in Leitungswasser für 5 min.

- Entwässern über die Alkoholreihe
- Spülen in Xylol 2 x
- Eindecken der Schnitte mit Eukitt

2.4. Immunhistochemie

Das Tumor-Suppressor-Genprodukt p53 und das Proliferationsmarker-Protein MIB 1 wurden immunhistochemisch mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen ⁴⁸.

2.4.1. Protokoll der Immunhistochemie

1. Vorbehandlung

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 3 x 7 min.
- Spülen in absolutem Alkohol 2 x

2. Blockierung der endogenen Peroxidasen

- Spülen in absolutem Methanol 2 x
- Inkubieren in 1% H₂O₂ in absolutem Methanol 30 min.
- Spülen in Aqua dest.

3. Antigen-Rückgewinnung

- Erhitzen in 0,1 mol Citratpuffer in der Mikrowelle bei 750 Watt 15 min.
- Abkühlen lassen 30 min.
- Spülen in PBS

4. Antikörper-Inkubation und Entwicklung

- Absättigen des Gewebes mit BSA-Lösung 100 µl pro Objektträger für 20 min.
- Abkippen der BSA-Lösung

- Inkubieren mit dem monoclonalen Primär-Antikörper gegen p53 (1:20 verdünnt mit PBS) bzw. MIB 1 (1:10 verdünnt mit PBS) 100 µl pro Objektträger für 45 min.
- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren mit dem Sekundär-Antikörper (1:20 verdünnt mit BSA-Lösung) 100 µl pro Objektträger 30 min.
- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren mit dem Tertiär-Antikörper (1:100 verdünnt mit BSA-Lösung)
- Spülen in PBS 3 x
- Inkubieren in DAB-Lösung 200 µl pro Objektträger für 3-4 min.
- Spülen in Leitungswasser zum Unterbrechen der Enzymreaktion
- Spülen in Aqua dest.
- Färben in Hämalaun-Lösung 2-5 min.
- Spülen in Aqua dest.
- Bläuen in Leitungswasser für 5 min.
- Entwässern über die Alkoholreihe
- Spülen in Xylol 2 x
- Eindecken der Schnitte mit Eukitt

2.5. Kontrollen

Als Kontrolle für die Spezifität der *In situ*-Hybridisierung dienten Mammarydrüsen-epithelzellen ohne pathologische Veränderungen und Lymphozyten in den jeweiligen Präparaten. Bei der Immunhistochemie wurde jeweils ein Kontrollschnitt mitgeführt, der nicht mit dem Primär-Antikörper inkubiert wurde.

2.6. Auswertungskriterien

Die Tumoren wurden pathohistologisch begutachtet. Dabei wurden für jeden Tumor bzw. jedes Tumoreal das Wachstumsmuster, der Kernatypie-Grad und das Vorhandensein einer Nekrose dokumentiert. Zum Kerngrading wurden die Kriterien der Van Nuys Klassifikation herangezogen. Demnach wurde dem Zellkern der Grad 1 zugewiesen, wenn dieser im Durchmesser 1 bis 1,5 Erythrozyten entsprach, diffuses Chromatin und keinen Nukleolus zeigte. Der intermediäre oder Grad-2-Zellkern wurde definiert als im Durchmesser 1-2 Erythrozyten groß, mit grobkörnigem Chromatin und selten vorhandenem Nukleolus. Als Zellkerne vom Grad 3 wurde solche Zellkerne bezeichnet, die größer als 2 Erythrozyten im Durchmesser waren, blasiges Chromatin und häufig einen oder mehr Nukleolen aufwiesen¹⁸. Die Comedo-Nekrose wurde wie von der *Consensus Conference on the Classification of ductal Carcinoma in situ* definiert. Sie wurde dort als Nekrose im Zentrum eines Drüsenganges beschrieben und sich, wenn sie längs angeschnitten war, als bandförmiges Muster im Drüsengang präsentierte⁴⁹. Die einzelnen Wachstumsmuster wurden den Typen Comedo, Clinging, papilläres, cribriformes und apokrines duktales Carcinoma in situ zugeordnet⁸.

Zur Bestimmung numerischer Chromosomen-Aberrationen wurde die Anzahl der *In situ*-Hybridisierungs-Signale in jeweils 200 Tumorzellen und als Kontrolle in 100 Zellen des Normalgewebes, meist Lymphozyten und unauffälliges Drüseneithel, lichtmikroskopisch bestimmt. Folgende Kriterien wurden der Signalinterpretation zugrunde gelegt: Es durften nur Kerne mit eindeutig definierbaren Grenzen ausgewertet werden. Die Signale innerhalb eines Zellkerns sollten die gleiche Größe besitzen. Paarige Signale (splitted spots), wie sie in der frühen Prophase durch Chromosomen-Verdopplung entstehen, wurden als ein Signal gewertet. Alle anderen Reaktionsprodukte der Immun-Peroxidase wurden nicht gewertet⁴⁷. Zum Vergleich der Signalverteilungen wurde der jeweilige Mittelwert pro Signalhäufigkeit sowie deren Spannweite berechnet und angegeben⁵⁰. Chromosomen-Aberrationen wurden im Sinne einer Trisomie definiert, wenn in einem Gewebe gleich oder mehr als 10% der analysierten Zellen mehr als zwei Signale zeigten³⁷. Eine Monosomie wurde

angenommen, wenn mehr als 45% der Zellen innerhalb einer Population nur ein Signal aufwiesen⁵¹.

Der Proliferations-Index eines Tumors wurde durch Auszählen der positiven Zellen im MIB-1-Antigen-Nachweis ermittelt. Seine Angabe erfolgt in Prozent der positiven Zellen eines Tumors. Ebenso wurde der Anteil p53-positiver Zellen erfaßt⁴⁸.

2.7. Statistische Auswertung

Das Auftreten von numerischen Aberrationen in den untersuchten Tumoren sollte mit den histopathologischen Klassifikationsparametern korreliert werden. Zur Prüfung auf statistischen Abhängigkeit zwischen Klassifikationsparameter und dem Bestehen einer Trisomie wurde der Vierfelder-Test angewandt. Die Signifikanz wurde bei gesichert Abhängigkeit durch den Chi-Quadrat-Test bestimmt und $p < 0.05$ festgesetzt.

2.8. Erfassung klinischer Daten

Für alle Patientinnen wurden die Krankenakten ausgewertet. Erfaßt wurden das Alter der Patientin, eine eventuell durch bildgebende Verfahren bestimmte Herdgröße und das Vorhandensein von Mikrokalk. Desweiteren waren maligne Erkrankungen der Mamma in der Vorgeschichte von Interesse.

3. Ergebnisse

3.1. Pathohistologische Begutachtung

Die pathohistologische Beurteilung der ausgewählten Gewebeproben ergab bei 25 Läsionen von 23 Patientinnen die Diagnose Carcinoma ductale in situ. In 5 Fällen dieser Gruppe wurde in jeweils einem einzigen Block ein mikroinvasives Tumorareal gefunden. Die Fälle 11 und 21 wurden aufgrund der pathohistologisch unterschiedlichen Entitäten als zwei, Fall 18 wurde als eine Läsion in die Statistik einbezogen (siehe Tabelle 1). Weiterhin umfaßte das Studienkollektiv 2 atypische duktale Hyperplasien, 3 atypische lobuläre Hyperplasien und 4 lobuläre Carcinomata in situ (detaillierte Angaben siehe Tabelle 1).

3.2. Zytogenetische Analyse

Die *In situ*-Hybridisierung ergab in allen Gewebe ausreichend reproduzierbare und auswertbare Ergebnisse. Lediglich die Hybridisierung für das Chromosom 20 wurde im Laufe der Untersuchungen aufgegeben, da dessen DNA-Probe auch nach maximaler Verstärkung keine hinreichend intensiven Signale lieferte.

In den Kontrollgeweben, in denen sich an keiner Stelle ein Anhalt für eine numerische Aberration fand, konnten für die einzelnen Proben weitreichend übereinstimmende und unauffällige Signalverteilungen ermittelt werden (siehe Tabelle 2).

Patient		Histologie				Zytogenetik				Immunhistochemie	
		Läsion	Wachstumsmuster	Nekrose	Kern-Grading	Trisomie				MIB %	p53 %
						1	7	8	18		
1		DCIS	Comedo	+	1					7,5	neg
2		DCIS	Comedo	+	2					15,0	neg
3		DCIS	Comedo	+	2					3,0	neg
4		DCIS	Comedo	+	2			+		6,0	neg
5		DCIS	Comedo	+	3		+	+		11,0	0,2
6		DCIS	Comedo	+	3	+	+	+		10,0	neg
7		DCIS m	Comedo	+	2		+	+		11,0	neg
8		DCIS m	Comedo	+	3	+	+	+		13,0	10,0
9		DCIS m	Comedo	+	2	+	+	+	+	5,0	neg
10		DCIS m	Comedo	+	3	+	+	+	+	18,0	90,0
11	A	DCIS m	Comedo	+	2	+	+	+	+	3,0	neg
	B	DCIS	Cribriform		2					7,0	neg
12		DCIS	Cribriform	+	1		+	+		6,0	neg
13		DCIS	Clinging	+	1					0,5	neg
14		DCIS	Clinging		1			+		15,0	neg
15		DCIS	Clinging		1	+				1,0	neg
16		DCIS	Clinging	+	2			+		12,0	neg
17		DCIS	Apokrin		1					11,0	neg
18	A	DCIS	Apokrin		2					3,0	neg
	B	DCIS	Apokrin	+	2	+	+			3,5	neg
19		DCIS	Papillär		1					6,0	neg
20		DCIS	Papillär		2					1,0	neg
21	A	DCIS	Papillär		1					7,0	neg
	B	DCIS	Comedo	+	2		+			8,0	neg
22		DCIS	Intrazystisch		1					3,0	neg
23	A	DCIS	Clinging		1					0,5	neg
	B	ALH			1					0,1	neg
24		ALH			2					0,5	neg
25	A	ALH			1					2,0	neg
	B	CLIS			2					1,0	neg
26		CLIS			1					1,0	neg
27		CLIS			1					2,0	neg
28		CLIS			1					0,5	neg
29		ADH			1					2,0	neg
30		ADH			2					0,5	neg

Abkürzungen: ALH *atypische lobuläre Hyperplasie* ADH *atypische duktile Hyperplasie*
m *Mikroinvasion*

Tabelle 1: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Signale per Nucleus (%)	Chromosom 1		Chromosom 7		Chromosom 8		Chromosom 18	
	Durchschnitt	Range	Durchschnitt	Range	Durchschnitt	Range	Durchschnitt	Range
<i>Kontrollgewebe</i>								
0 und 1 Signal	32,1	24-45	36,1	23-45	36,2	29-45	38,3	30-45
0 Signale	6,1	2-15	6,0	1-12	5,8	2-12	6,1	2-14
1 Signal	26,0	19-27	30,1	20-38	30,4	24-39	32,2	26-42
2 Signale	68,0	38-76	63,2	55-77	63,8	55-71	58,7	55-70
<i>Tumorgewebe</i>								
0 und 1 Signal	32,9	24-43	34,0	18-45	33,7	18-44	38,7	19-45
0 Signale	6,1	2-12	4,3	1-10	4,8	2-14	6,3	2-12
1 Signal	26,8	18-39	29,7	15-42	28,9	15-42	32,4	15-40
2 Signale	64,4	48-76	59,3	44-71	59,2	41-72	58,3	30-71
3 Signale	12,5	3-33	13,9	1-23	17,9	5-34	9,6	1-36
4 Signale	2	2	5	2-10	5,5	2-11	9,0	3-15

Tabelle 2: Signal-Verteilungen im Tumor- und Kontrollgewebe

Im neoplastischen Gewebe wurden bei 14 von 25 DCIS (56%) eine Trisomie für mindestens eines der hybridisierten Chromosomen gefunden. Bei den beiden atypischen duktalem Hyperplasien waren keine chromosomalen Auffälligkeiten nachweisbar. Ebenso war die Analyse der lobulären Läsionen vollständig unauffällig. Eine Monosomie war in keinem der Fälle des Untersuchungsmaterials weder im Normalgewebe noch in den Neoplasien zu detektieren.

Von der Inzidenz einer Trisomie waren die einzelnen Chromosomen in unterschiedlicher Häufigkeit betroffen. Die Trisomie 1 zeigte sich in 25% aller DCIS in der vorliegenden Arbeit. 5 von 7 DCIS-Fällen mit Trisomie 1 ließen sich der Gruppe

der High-Grade-DCIS vom Comedo-Subtyp zuordnen. Im Vergleich dazu war die Trisomie für Chromosom 7 und 8 häufiger zu finden. Eine Trisomie 7 war in 10 von 25 DCIS-Fällen (40%) und eine Trisomie 8 in 11 von 25 Fällen (44%) nachweisbar. Das gemeinsame Auftreten von Trisomie 7 und 8 war bei 8 DCIS der Fall. Die Trisomie 18 zeigte die geringste Inzidenz mit 3 von 25 Fällen (12%). Sie trat nur mit den Trisomien der anderen untersuchten Chromosomen auf und war immer mit einer Mikroinvasion vergesellschaftet.

3.3. Klassifikationsparameter und deren Korrelation mit der zytogenetischen Analyse

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der zytogenetischen Analyse und den histologischen Parametern des DCIS ergab folgende Korrelationen: Das Vorhandensein einer Nekrose war bei den Fällen mit numerischen Aberrationen signifikant erhöht. 12 von 16 Fällen mit einer Tumor-Nekrose (75%) wiesen mindestens eine Trisomie auf, im Gegensatz dazu nur 2 von 9 Fällen ohne Nekrose (22%) ($p < 0.009$) (siehe Diagramm 1). Mit steigendem Kern-Atypie-Grad wurde auch eine Zunahme der Trisomie-Häufigkeit beobachtet. Nur 3 von 10 Fällen des Kern-Grades I war von einer Trisomie betroffen. 7 von 11 Fällen mit Kern-Grad II zeigten mindestens eine Trisomie, während alle Fälle mit Kern-Grad III Trisomien aufwiesen ($p < 0.017$) (siehe Diagramm 2). Die Trisomie 7 trat nur in Verbindung mit dem Comedo-Subtyp auf. Die unterschiedlichen Wachstumsmuster des DCIS ließen sich nicht signifikant mit der Inzidenz einer numerischen Chromosomen-Aberration korrelieren (siehe Diagramm 3).

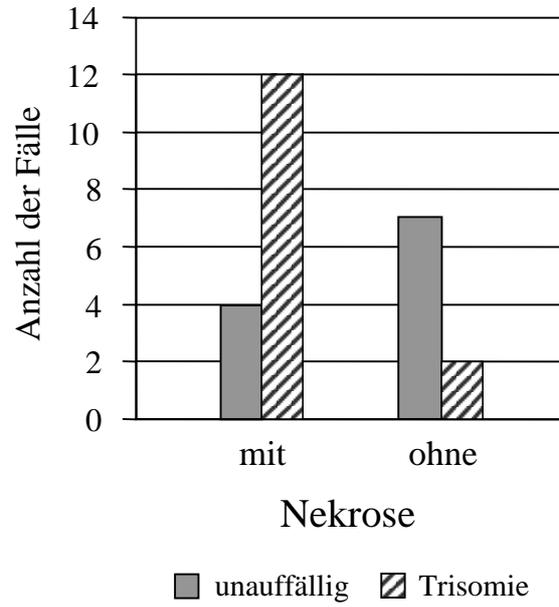


Diagramm 1: Korrelation zwischen Trisomie- und Nekrose-Inzidenz im DCIS

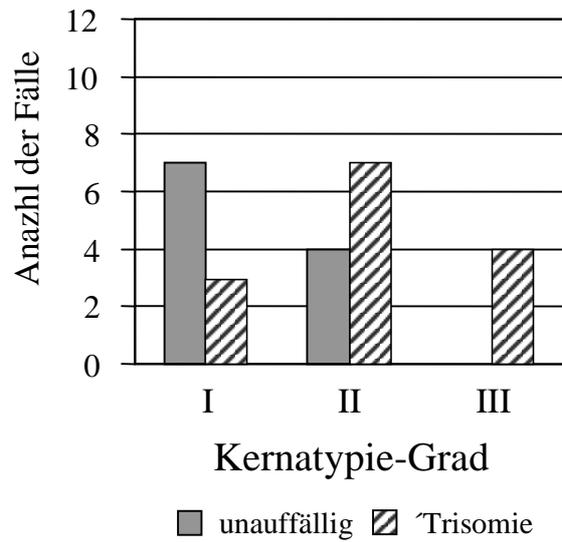


Diagramm 2: Korrelation zwischen Trisomie-Inzidenz und Kern-Atypie-Grad im DCIS

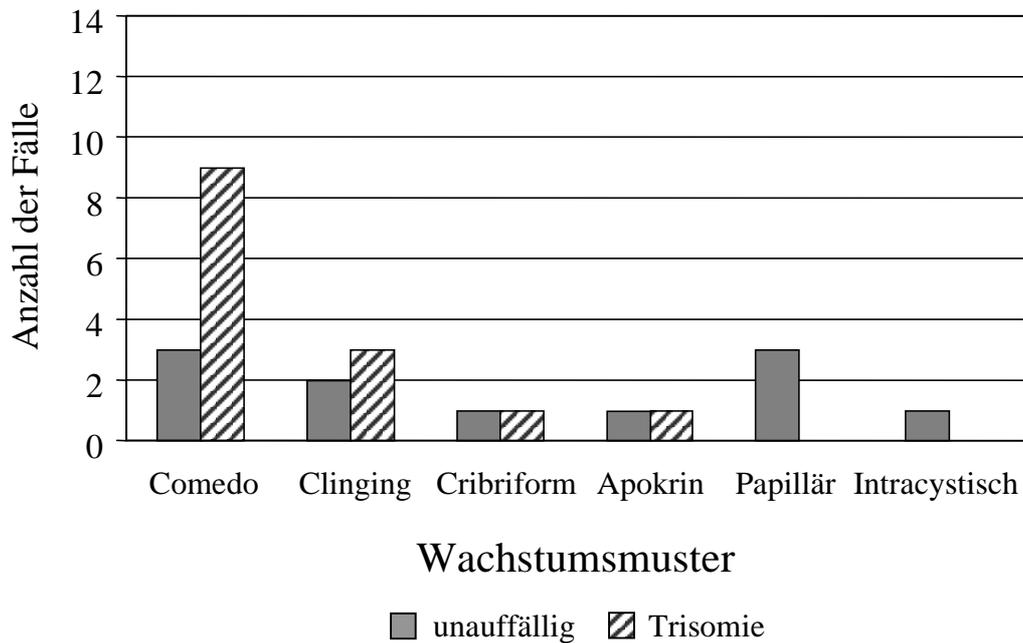


Diagramm 3: Korrelation zwischen Trisomie-Inzidenz und Wachstumsmuster im DCIS

3.4. Tumoren mit heterogener Histopathologie

Bei drei Patientinnen wurden DCIS gefunden, die sich innerhalb des Tumors unterschiedlich differenziert hatten. Das DCIS des Falles 11 wies einen Anteil mit dem Muster des Comedo-Karzinoms und dessen charakteristischen Nekrosen auf. Hier waren auch vereinzelt mikroinvasive Herde anzutreffen. Der zweite Teil verfügte deutlich über ein cribriformes, nekrose- und invasionsfreies Wachstumsverhalten (siehe Abbildung 1, Seite 22). Fall 21 präsentierte sich an einer Stelle als Comedo-Karzinom, während die übrigen Milchgänge mit papillär differenzierten Tumormassen ausgefüllt waren (siehe Abbildung 2, Seite 23). Bei dem apokrinen DCIS des Falls 18 zeigten einige Tumorareale eine im Milchgang zentral gelegene Nekrose, die dem Tumor an dieser Stelle das Aussehen eines Comedo-Karzinoms gab (siehe Abbildung 3, Seite 24). Diesen drei Tumoren war von Seiten der zytogenetischen Analyse gemeinsam, daß sich Trisomien nur in solchen Tumorarealen fanden, die auch eine Nekrose ausgebildet hatten.

3.5. Auswertung der immunhistochemischen Bestimmung von p53 und MIB

Der immunhistochemische Nachweis des p53-Tumor-Suppressor-Genproduktes war für ein nicht invasives und zwei mikroinvasive duktales Karzinome positiv. Es konnten hierbei nur intraduktale Bereiche gewertet werden.

Die Proliferationsaktivität der untersuchten Läsionen schwankte mit einem MIB-Index von 0,1 bis 18 %. Er lag bei den duktales Läsionen deutlich höher als bei den lobulären (siehe Tabelle 3). Eine direkte Korrelation zu zytogenetischen Befunden bestand nicht.

Proliferations-Index (MIB) in %	Fallzahl	Durchschnitt	Minimum	Maximum
<i>Lobuläre Läsionen</i> (3 ALH, 4 CLIS)	7	1,0	0,1	2,0
<i>Duktale Läsionen</i> (2 ADH, 25 DCIS)	27	6,9	0,5	18,0

Tabelle 3: Proliferationsaktivität (MIB-Index)

3.6. Klinische Befunde

Für die 23 Patientinnen mit der Diagnose DCIS lag das Erkrankungsalter im Durchschnitt bei 59 Jahren bei einer Standardabweichung von 13,97 Jahren. Es schwankte zwischen 33 und 87 Jahren. In 8 Fällen ließ sich nachträglich die Tumorgroße aus radiologischen Angaben ermitteln. Sie lag zwischen einem und drei Zentimetern im Durchmesser. 12 DCIS-Läsionen hatten Mikrokalk eingelagert Die Auswertung der Krankenvorgeschichte ergab bei 4 Patientinnen mit DCIS eine Karzinom-Erkrankung der kontralateralen Mamma. Dies war ebenso bei einer

atypischen lobulären Hyperplasie und einem Carcinoma lobulare in situ der Fall. Es bestand keine statistisch signifikante Beziehung zwischen den klinischen und zytogenetischen Befunden.

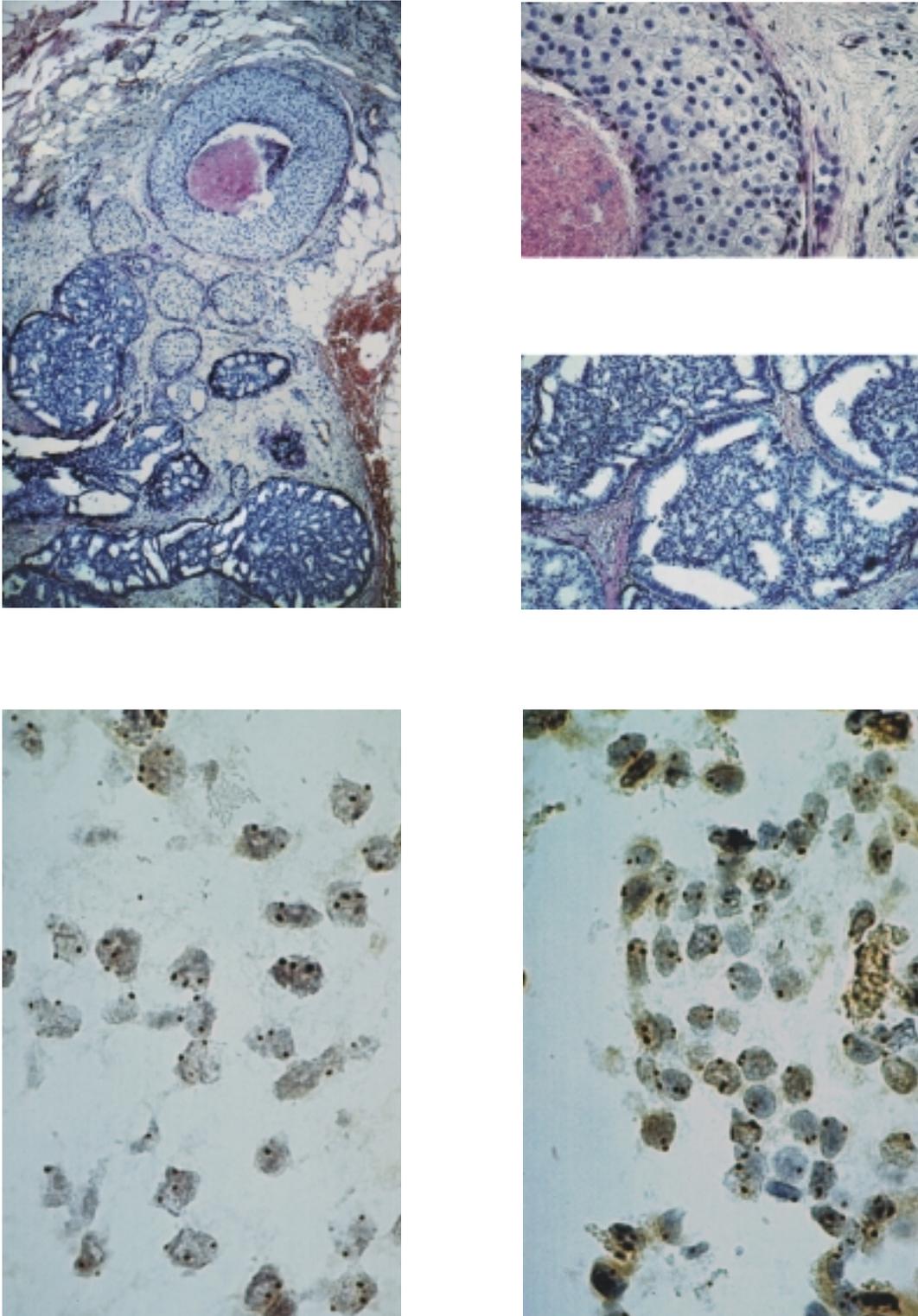


Abbildung 1: DCIS mit Comedo- und cribriformer Differenzierung. *Oben links*: Übersicht, HE-Färbung, Vergrößerung 1:25. *Oben rechts*: Comedo-Wuchsform desselben Tumors, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Mitte rechts*: Cribriforme Komponente, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Unten links*: Comedo-Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (Trisomie 7), Vergrößerung 1:640. *Unten rechts*: Cribriforme Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (unauffällige Signalverteilung), Vergrößerung 1:640.

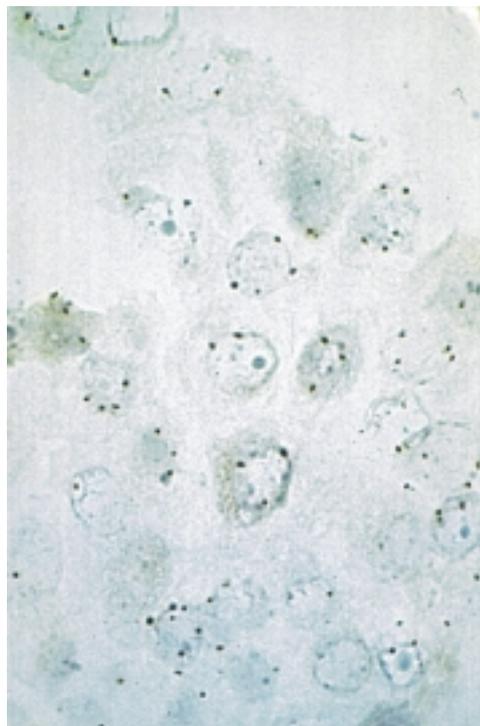
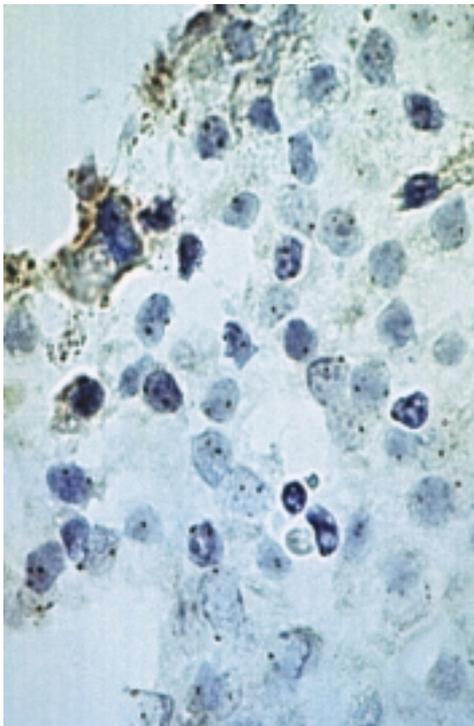
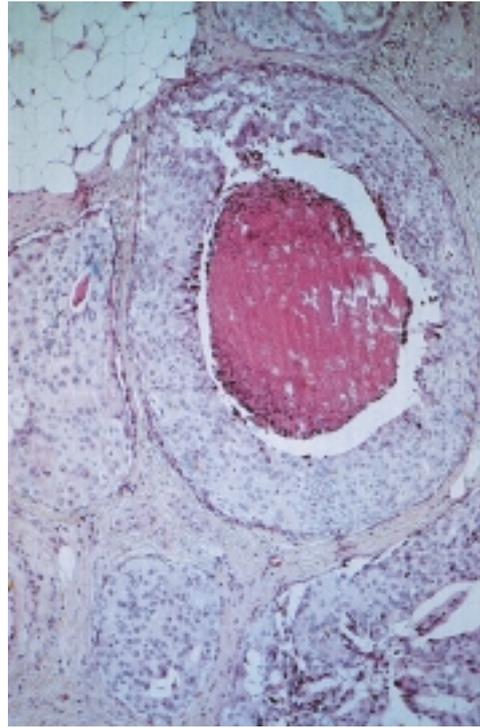
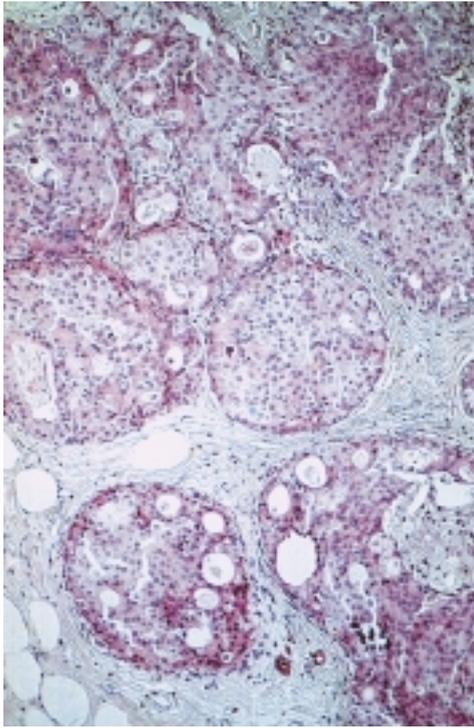


Abbildung 2: DCIS mit apokriner Differenzierung. *Oben links*: Cribriforme Wuchsform, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Oben rechts*: Comedo-Wuchsform desselben Tumors, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Unten links*: Cribriforme Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (unauffällige Signalverteilung), Vergrößerung 1:640. *Unten rechts*: Comedo-Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (Trisomie 7), Vergrößerung 1:640.

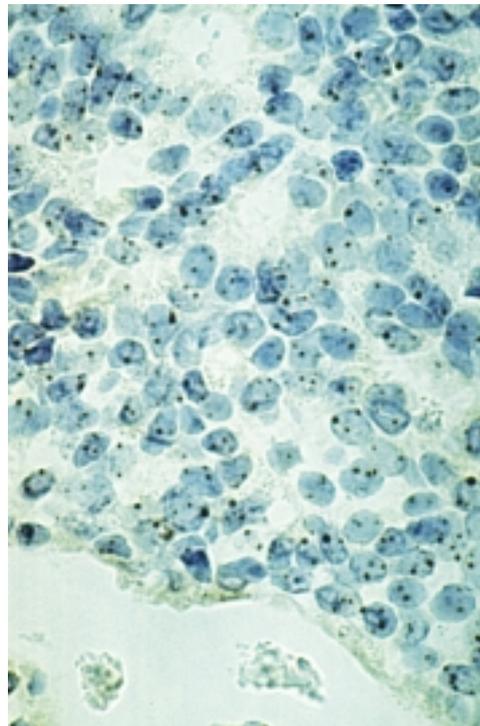
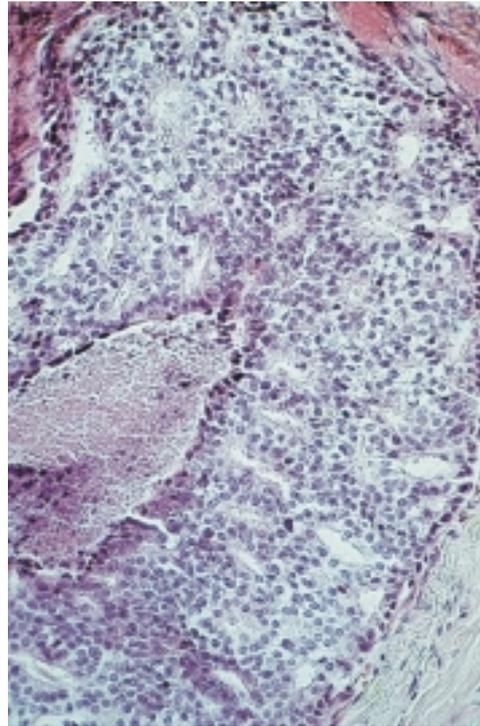
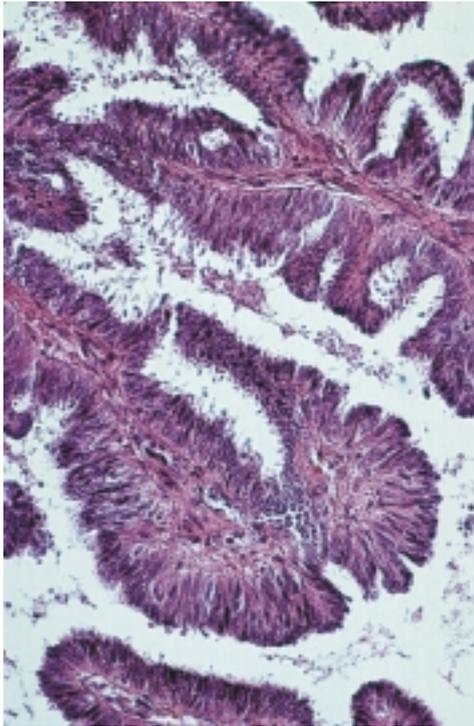


Abbildung 3: DCIS mit papillärer und Comedo- Differenzierung. *Oben links*: Papilläre Wuchsform, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Oben rechts*: Comedo-Wuchsform desselben Tumors, HE-Färbung, Vergrößerung 1:100. *Unten links*: Papilläre Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (unauffällige Signalverteilung), Vergrößerung 1:640. *Unten rechts*: Comedo-Komponente, *In situ*-Hybridisierung für Chromosom 7 (Trisomie 7), Vergrößerung 1:640.

4. Diskussion

Es ist ein Anliegen pathohistologischer Klassifikationen von Tumorerkrankungen, einzelne Klassifikationskriterien zu objektivieren und pathogenetische Kenntnisse in den etablierten Klassifikationsrichtlinien zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wird eine enge Korrelation zwischen histomorphologischen Klassifikationsparametern des duktales Carcinoma in situ der Mamma und zytogenetischen Veränderungen des Erbgutes der Karzinomzellen aufgezeigt. Es gelang, eine hohe Korrelation zwischen Kern-Atypiegrad und Aneusomien darzustellen. Auch für den Typ der Comedo-Typ der Nekrose konnte eine signifikante Beziehung zu Trisomien demonstriert werden. Diese statistische Korrelation war auch in einer direkten räumlichen Beziehung nachzuweisen: in drei DCIS-Fällen, bei denen der Tumor eine heterogene Morphologie präsentierte, waren Trisomien nur in Tumorarealen mit Grad-3 Kernen und/oder Comedo-Nekrosen zu detektieren. Diese enge räumliche Assoziation untermauert die Korrelation zwischen diesen pathohistologischen Kriterien und der Trisomie im DCIS.

Mit Hilfe chromosomen-spezifischer Proben wurden in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Kopien des jeweiligen Chromosoms in situ nachgewiesen. Jedes menschliche Chromosom beinhaltet neben den kodierenden Sequenzen nicht-kodierende hochrepetitive Areale⁵². In denen als alpha-Satelliten-DNA bezeichneten Abschnitte unterscheiden sich die einzelnen Chromosomen in charakteristischer Weise⁵³. Diese waren zunächst nur durch Dichtezentrifugation zu reinigen⁵⁴. Nachdem es aber Gall und John erstmals 1969 gelungen war, repetitive DNA-Sequenzen mittels radioaktiv markierter RNA-Sonden an zytologischen Präparaten nachweisen, waren infolge auch die hochrepetitiven Satelliten-Abschnitte des Genoms dem *in situ*-Nachweis zugänglich^{55, 56}. 1991 stellte Hopman eine Methode zum Nachweis numerischer Chromosomen-Abberationen mittels DNA-in situ-Hybridisierung am Paraffin-Schnitt in Blasen-Karzinomen vor⁴⁷. Dieses Protokoll, das eine Detektion im Hellfeld ermöglicht, diente auch der vorliegenden Studie als Grundlage zur Durchführung der Hybridisierung und war in leicht abgewandelter auch in vorangehenden Arbeiten wie zum Beispiel von Harrison im Jahre 1995 und Micale 1994 an DCIS-Paraffin-Gewebe eingesetzt worden^{39, 51}. Als Kriterien zur Detektion einer Trisomie waren von Micale

und allen weiter folgenden Untersuchern für das DCIS die Grenze bei 10% der Zellen mit 3 Signalen pro Kern gezogen worden. Für die Monosomie ergab sich diese bei mehr als 45% der Kerne mit 0 und 1 Signal pro Kern. Als Kontrollengewebe waren zumeist nicht neoplastisch veränderte Gängepithelien und Lymphozyten ausgezählt worden⁵¹.

Innerhalb der publizierten Studien zur Untersuchung von frühen Neoplasien der Mamma waren zumeist die FISH-Technik an Zellvereinzelnungen oder Tumor-Abstrichen zum Einsatz gekommen. Bei diesen Arbeiten ist folglich die unmittelbare Korrelation zwischen Tumormorphologie und den gefundenen zytogenetischen Veränderungen aufgrund der Technik schwierig durchzuführen. Auch lassen sich kleine invasive Foci nicht ohne weiteres erkennen und separat analysieren. Es sollen nun im Folgenden solche Arbeiten näher diskutiert werden, die auch im Rahmen ihrer Methodik Angaben zur Tumormorphologie machen können, wobei ein direkter Vergleich im Einzelnen schwierig erscheint, da Angaben zur Morphologie oft nur unzureichend präzisiert wurden.

Das Studienkollektiv Visschers umfaßte 10 Patientinnen mit intraduktalem Karzinom, wovon die Hälfte stellenweise mit einer Mikroinvasion vergesellschaftet waren. Erzielte Werte für chromosomale Trisomien in mit vorliegender Studie vergleichbarer Größenordnung. Die Analyse wurde mit Proben für die Chromosomen 1, 7, 8, 16, 17 und X durchgeführt. Dort gelang der Nachweis numerischer Chromosomen-Aberrationen in 70% aller Fälle. Bei den Karzinomen ohne mikroinvasiven Anteile lag die Trisomie-Rate bei 40%, bei denen mit Koinzidenz einer Invasion bei ebenfalls 100% der untersuchten Fälle³⁷. In einer Studie von Harrison wurden für 21 Fälle von duktalem Carcinoma in situ Paraffin-Material hybridisiert und auf Aneusomie 1 untersucht. Die Trisomie-Rate lag bei 86%. Die Auswahl der Fälle beschränkte sich jedoch fast ausschließlich auf die Untergruppe der Comedo-Karzinome bzw. High-Grade-DCIS, innerhalb derer auch bei vorliegender Arbeit die höchste Inzidenzrate an Trisomie 1 detektieren werden konnte. Harrison benutzte für die Hybridisierung keine kommerzielle Sonde gegen die Centromer-Region des Chromosoms 1, sondern eine selbst markierte Probe der pUC 1.77-Sonde, die nicht allgemein verfügbar ist³⁹. Sneige und dessen Mitarbeiter erfaßten in einer vergleichenden Untersuchung 25 Erkrankungen

der Mamma: 5 nicht proliferative Läsionen, 9 atypische Hyperplasien, 4 duktales Carcinoma in situ, 6 invasiv duktales und ein invasiv lobuläres Karzinom.

Die an direkten Tumorabstrichen für die Chromosomen 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18 und X durchgeführte Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zeigte bei den duktales Carcinomata in situ zahlreiche Tri- und Monosomien. Hiervon waren in zwei Fällen für mindestens 4 der hybridisierten Chromosomen Trisomien detektierbar. Es konnte jedoch keine bestimmte Aberration in mehr als zwei Fällen gefunden werden⁴⁰. Von Murphy und dessen Arbeitsgruppe wurde das duktales Carcinoma in situ an 30 Proben von 21 Patientinnen in Fluoreszenz-Technik untersucht. Der Schwerpunkt der Studie lag auf der Ermittlung einer Korrelation zwischen einer Amplifizierung des ERBB2-Gens und numerischen Chromosomenaberrationen. Vermehrungen der Chromosomen 3, 10 und 17 wurden in jeweils 11 von 23, 9 von 23 und 23 von 29 Tumorproben mit Abstand am häufigsten gefunden³⁸.

Eine Betrachtung der einzelnen Trisomien macht deutlich, daß die verschiedenen Chromosomen in unterschiedlicher Häufigkeit betroffen sind. Diesen Befund bestätigen alle vorangehend zitierten Studien. Die Trisomie 1, untersucht mit einer Probe gegen den Genlocus 1p36, trat im untersuchten Patientengut bei 25% aller untersuchten intraduktalen Carcinomata auf. Damit liegt das Ergebnis deutlich unter der oben erörterten Studie von Harrison mit einer ermittelten Häufigkeit von 89%³⁹. Mit vorliegender Studie vergleichbar niedrige Werte werden von Visscher und Murphy angegeben, die ebenfalls Paraffin-Material hybridisierten^{37, 38}. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente mit einer Sonde gegen die Centromer-Region des Chromosom 1 erbrachten an dem zur Verfügung stehendem Paraffin-Material nur unbefriedigende Ergebnisse. Es ließen sich keine geeigneten Stringenzbedingungen ermitteln, die im Normalgewebe zuverlässig weniger als 3 Signale erbrachten. Eine Kreuz-Reaktion mit den Centromeren anderer Chromosomen konnte auch vom Sonden-Hersteller nicht ausgeschlossen werden. Als Alternative bot sich die Detektion des Chromosoms 1 mit einer Telomer-Sonde gegen einen Locus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 an. Der Einsatz einer Probe gegen 1p36 ergab zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse. Weitaus häufiger waren die Trisomien 7 und 8. Sie lagen in

jeweils 9 und 10 der 25 intraduktalen Karzinome vor. Während die Trisomie 7 in nur einem Fall als alleinige Aberration vorlag, war das gemeinsame Auftreten beider Trisomien in der Hälfte aller zytogenetisch auffälligen Läsionen nachweisbar (7 von 13 Fällen). Bei den 10 Fällen, die Visscher auf Trisomie 7 und 8 untersuchte, konnte er ebenfalls häufiger ein kombiniertes Erscheinen der Trisomien 7 und 8 (4 Fälle) im Vergleich zu nur jeweils einem Fall für die Einzeltrisomie des Chromosoms 7 bzw. 8 angeben³⁷. Am seltensten konnte eine Trisomie 18 in 3 von 25 Fällen detektiert werden, die alle mit einer Mikroinvasion vergesellschaftet waren. Dies bestätigt Ergebnisse von Micale, wo über eine Trisomie 18 im Falle eines teilweise mikroinvasiven DCIS berichtet wird⁵¹. Eine Synopsis aller auf numerische Aberrationen des Chromosoms 18 hin untersuchten DCIS-Fälle zeigt deutlich die Abwesenheit einer Trisomie 18 bei Fehlen einer Mikroinvasion (n=47; vorliegende Daten eingeschlossen). Diese Befunde machen eine enge Assoziation zwischen Trisomie 18 und dem Übergang der Tumorphase in ein invasives Stadium wahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse werden von Buerger und dessen Arbeitsgruppe berichtet, die mittels vergleichender genomischer Hybridisierung intraduktale Karzinome untersuchten. Innerhalb ihres Tumorkollektives, das 38 Fälle umfaßte, wurde eine Trisomie 18 nur in 2 Fällen detektiert: ein high-grade-DCIS und ein DCIS mit einer mikroinvasiven Komponente⁵⁷. Offensichtlich kann eine Trisomie 18 nicht der einzige genetische Faktor sein, der den Übergang von einem benignen in malignes Geschehen markiert und bedingt. Es ist sicherlich ebenso von Bedeutung, ob es sich bei der Trisomie des Chromosoms 18 um die einzige oder eine von mehreren genetischen Alterationen eines Tumorgenoms handelt. Eine isolierte Polysomie des Chromosoms 18 wurde bereits in 2 Fällen von fibrocystischer Mastopathie und in einem von neun Fällen von Adenofibromen der Mamma mittels Metaphasen-Präparation nach Kurzzeit-Kultur ermittelt^{58,59}. Auch wird an anderer Stelle in der Literatur die Monosomie 18 für das DCIS angegeben^{38,40}. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind Trisomien geeignete Marker, um eine Zunahme genetischer Veränderungen in einem malignen Prozeß anzuzeigen, die ihrerseits mit einer biologischen Tumorphase verbunden sein können; andererseits stellen sie selbst das Ergebnis einer erhöhten genetischen Instabilität dar.

Chromosomale Monosomien im DCIS konnten bereits deutlich in vorangegangenen Studien demonstriert werden. Der Verlust des Chromosoms 18 wurde von Murphy und Sneige in Fällen von DCIS nachgewiesen^{38,40}. Diese Befunde können durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. So erbrachte auch der Vergleich der Signalverteilung zwischen normalem und neoplastischem Gewebe keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein einer Monosomie. Die erzielten Werte liegen deutlich unter der Grenze von 45% der Zellen mit weniger als zwei Signalen, wie sie von Micale eingeführt worden war⁵¹.

Zur weiteren Charakterisierung dieser intraduktalen Neoplasie der Mamma wurde das Proliferationsverhalten und die Expression des p53-Proteins untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine geringe Proliferationsrate in den vorliegenden DCIS-Fällen, wie sie für das DCIS bereits beschrieben worden waren. Weiterhin ergaben sich keine Assoziationen zur Aneusomie, worüber auch keine Vergleichsuntersuchungen vorliegen. In einer Studie von Wintzer wurden die Proliferationsraten in nicht-malignem Mamma-Gewebe mit DCIS-Tumoren verglichen, mit dem Ziel, eine unabhängige Korrelation zur Prognose herzustellen, was sich statistisch aber nicht bestätigte. Für die benignen Läsionen einschließlich des Normalgewebes wird eine Rate von 2,1% und für das DCIS eine solche von im Durchschnitt 14,5% angegeben⁶⁰. Diese Befunde decken sich weitgehend mit denen der vorliegenden Studie. Die Analyse histologischer und immunhistochemischer Marker im DCIS durch Dublin zeigte auch dort eine niedrige Proliferation gemessen an der Ki-67 Expression, wobei sich auch hier keine Korrelationen zum Follow-up aufzeigen ließen⁶¹. Die verstärkte Expression des p53-Tumorsuppressorgens konnte in vorliegender Arbeit in nur 3 Fällen nachgewiesen werden, was eine statistische Auswertung nicht möglich macht. Ebenfalls war in der Vergangenheit von einer niedrigen Expressionsrate berichtet worden. Als Beispiel seien die Untersuchungsergebnisse von Rajan angeführt. Das p53-Genprodukt war hier in 18% der Fälle (n=81) von Non-Comedo-DCIS und in 25% der Fälle (n=52) von Comedo-Karzinomen nachgewiesen worden. Ein signifikanter Unterschied in der Lokalrezidiv-Wahrscheinlichkeit zwischen diesen beiden Gruppen war allerdings statistisch nicht zu beweisen⁶². Für die Comedo-Gruppe lassen sich diese Befunde durch die vorliegenden Zahlen bestätigen (3 von 12 Fällen); allerdings war das p53-

Genprodukt bei den Non-Comedo-Karzinomen im ausgewählten Untersuchungskollektiv gar nicht detektierbar. Dies ließe sich möglicherweise durch die stark differierenden Fallzahlen erklären. Eine direkte Korrelation zwischen zytogenetischen Befunden und den oben genannten Markern war zusammenfassend nicht abzuleiten, wofür auch keine vorangegangenen Untersuchungen in der Literatur auffindbar waren. So sprechen auch diese Befunde nochmals für die Bedeutung der rein morphologischen Kriterien bei der Klassifikation des DCIS.

5. Zusammenfassung

Das duktales Carcinoma in situ der Mamma stellt eine Neoplasie mit sowohl heterogener Morphologie als auch variierendem biologischen Verhalten dar. Dies führte in der Vergangenheit zur Etablierung zahlreicher pathohistologischer Klassifikationssysteme mit dem Ziel, das Risiko einer malignen Transformation in ein invasives Carcinom und die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs nach Tumorektomie anhand histologischer Kriterien abzuschätzen. Zur Untersuchung solcher Klassifikationsparameter auf ihre Wichtigkeit sollte der genetische Hintergrund am Beispiel der chromosomalen Trisomie untersucht werden und mit diesen korreliert werden.

Die Ergebnisse einer DNA-*in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Proben für die Chromosomen 1, 7, 8 und 18 zeigen, daß Trisomien in dieser Neoplasie ein häufiges Ereignis darstellen (56% aller Fälle) und daß diese mit den histologischen Parametern der Nekrose und einem hohen Kernatypiegrad korrelieren. Dieser Befund wird durch die Tatsache untermauert, daß solche Beziehungen sogar im gleichen Tumor gefunden wurden, wenn dieser eine heterogene Morphologie aufwies. So läßt sich die große Bedeutung der Klassifikationsparameter Nekrose und Kern-Atypie auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen.

Eine Trisomie des Chromosoms 18 konnte nur in Fällen von einer Koinzidenz mit mikroinvasiven Herden detektiert werden. Dies deckt sich mit sämtlichen Angaben der Literatur, bei denen eine Trisomie 18 nie bei streng intraduktalem DCIS, sondern nur bei mikroinvasiven oder invasiven Mamma-Karzinomen gefunden wurde. Folglich wäre es wichtig, mit weiteren Untersuchungen die Bedeutung dieser Aberration im Invasionsgeschehen und in der Diagnosestellung einer Mikroinvasion des DCIS zu analysieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W: Breast Cancer. N Engl J Med 1992; 327:319, 390, 473
2. Holford TR, Roush GC, McKay LA: Trends in female breast cancer in Connecticut and the United States. J Clin Epidemiol 1991; 44:29
3. Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer statistics: 1993, CA. Cancer J Clin 1993; 43:7
4. ohne Autor: Cancer facts and figures – 1993. American Cancer Society, Atlanta, 1993
5. Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart, 1995
6. Margolin FR, Lagios MD: Mammographic detection of early breast cancer: ten years' experience in a community hospital. West J Med 1986; 144:46-48
7. The World Health Organization histological typing of breast tumors – second edition. Am J Clin Pathol 1982, 78:806-816
8. Page DL, Anderson TJ: Diagnostic histopathology of the breast. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987
9. Azzopardi JG: Epitheliosis and in situ carcinoma. In: Problems in breast pathology. Saunders, Philadelphia, 1979
10. Patchefsky AS, Schwartz GF, Finkelstein SD, Prestipino A, Sohn SE, Singer JS, Feig SA: Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast. Cancer 1989; 63:731-741
11. Millis RR, Thynne GSJ: In situ intraduct carcinoma of the breast: a long term follow-up study. Br J Surg 1975; 62:957-962
12. Bellamy COC, McDonald C, Salter DM, Chetty U, Anderson TJ: Noninvasive carcinoma of the breast: the relevance of histologic categorization. Hum Pathol 1993; 24:16-23
13. Lagios MD, Margolin FR, Westdahl PR, Rose MR: Mammographically detected duct carcinoma in situ: frequency of local recurrence following tyelectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. Cancer 1989; 63:618-624

14. Millis RR: Classification of ductal carcinoma in situ of the breast. *Adv Anat Pathol* 1996; 3:114-129
15. Scott MA, Lagios MD, Axelsson K, Rogers LW, Anderson TJ, Page DL: Ductal carcinoma in situ of the breast: reproducibility of histological subtype analysis. *Hum Pathol* 1997; 28:967-973
16. Tavassoli FA, Man Y: Morphofunctional features of intraductal hyperplasia, atypical intraductal hyperplasia, and various grades of intraductal carcinoma. *Breast J* 1995; 1:155-162
17. Holland R, Peterse JL, Millis R, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ, Zafrani B: Ductal carcinoma in situ: a proposal for new classification. *Semin Diagn Pathol* 1989; 11:167-180
18. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, Poller DN: A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1996; 77:2267-2274
19. Rosen PP, Braun DW, Kinne DE: The clinical significance of preinvasive breast carcinoma. *Cancer* 1980; 46 (4. Suppl.):919-925
20. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Landenberger M: Intraductal carcinoma of the breast follow-up after biopsy only. *Cancer* 1982; 49:751-758
21. Lewin B: *Genes VI*. Oxford University Press, New York, 1997
22. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767
23. Mitelman F: *Catolog of chromosome aberrations in cancer*. Wiley-Liss, New York, 1994
24. Gebhard E, Brüderlein S, Augustus M, Siebert E, Feldner J, Schmidt W: Cytogenetic studies on human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 8:125-138
25. Gerbault-Seureau M, Vielh P, Zafrani B, Salmon R, Dutrillaux B: Cytogenetic study of twelve human near-diploid breast cancers with chromosomal changes. *Ann Genet* 1987; 30:138-145
26. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Zafrani B: Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49:203-217

27. Trent J, Yang JM, Emerson J, Dalton W, McGee D, Massey K, Thompson F, Villar H: Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas II. thirty-four cases with metastatic disease. *Genes Chrom Cancer* 1993; 7:194-203
28. Devilee P, Cornelisse CJ: Genetics of human breast cancer. *Cancer Surv* 1990; 9:605-630
29. Trent JM: Cytogenetic and molecular biologic alterations in human breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5:221-229
30. Pandis N, Heim S, Bardi G, Idvall I, Mandahl N, Mitelman F: Whole-arm t(1;16) and i(1q) as sole abnormalities identify gain of 1q as the primary chromosomal abnormality in breast cancer. *Genes Chrom Cancer* 1992; 5:235-238
31. Rodgers CS, Hill SM, Hulten MA: Cytogenetic analysis in human breast carcinoma. I. Nine cases in the diploid range investigated using direct preparations. *Cancer* 1984; 13:95-119
32. Mitchell ELD, Santibanez-Koref MF: 1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. *Genes Chrom Cancer* 1990; 2:278-289
33. Kokalj-Vokac N, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B: Two-color FISH characterization of i(1q) and der(1;16) in human breast cancer cells. *Genes Chrom Cancer* 1993, 7:8-14
34. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mitelman F, Heim S: Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes, Chromosom Cancer* 1995; 12:173-185
35. Pandis N, Heim S, Bardi G, Idvall I, Mandahl N, Mitelman F: Chromosome analysis of 20 breast carcinomas: Cytogenic multiclonality and karyotypic-pathologic correlations. *Genes Chrom Cancer* 1993; 6:51-57
36. Bullerdiel J, Leuschner E, Taquia E, Bonk U, Bartnitzke S: Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer ? *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 65:64-67

37. Visscher DW, Wallis TL, Crissman JD: Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. *Cancer* 1996; 77:315-320
38. Murphy DS, Hoare SF, Going JJ, Mallon EA, George WD, Keith WN: Characterization of extensive genetic alterations in ductal carcinoma in situ by fluorescence in situ hybridization and molecular analysis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1694-1704
39. Harrison M, Magee HM, O'Loughlin J, Gorey TF, Dervan PA: Chromosome 1 aneusomy, indentified by interphase cytogenetics, in mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 1995; 175:303-309
40. Sneige N, Sahin A, Dinh M, El-Naggar A: Interphase cytogenetics in mammographically detected breast lesions. *Hum Pathol* 1996; 27:330-335
41. Yoshimi N, Shibuya C, Morishita Y, Tanaka T, Mori H: The numerical aberrations of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization in human breast cancers. *Acta Pathol Japon* 1993; 43:730-735
42. Connolly JL, Schnitt SJ: Benign breast disease: resolved and unresolved issues. *Cancer* 1993; 71:1187-1189
43. Page DL, Kidd TE Jr, Dupont WD, Simpson JR, Rogers LW: Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol* 1991; 22:1232-1239
44. Rosen PP, Kosloff C, Liebermann PH, Adair F, Braun DW Jr: Lobular carcinoma in situ of the breast: detailed analysis of 99 patients with average follow-up of 24 years. *Am J Surg Pathol* 1978; 2:225-251
45. Seshadri R, Leong ASY, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ: Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer* 1996; 69:135-141
46. Kreipe H, Alm P, Olsson H, Hauberg M, Fischer L, Parwaresch R: Prognostic significance of a formalin-resistant nuclear proliferation antigen in mammary carcinomas as determind by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol* 1993; 142:651-657
47. Hopman AHN, van Hooren E, van de Kaa A, Voojjs PGP, Ramaekers CS: Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in

- paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 1991; 4:503-513
48. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P: Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993; 71:3926-3931
 49. Schwartz GF, Lagios MD (conference chairman and cochairman): Consensus conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol* 1997; 80:1798-1802
 50. Dhingra K, Sneige N, Pandita TK, Johnston DA, Lee SJ, Emami K, Hortobagyi GN, Hittelman WN: Quantitative analysis of chromosome in situ hybridization signal in paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry* 1994; 16:100-112
 51. Micale MA, Visscher DW, Gulino SE, Wolman SR: Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease. *Hum Pathol* 1994; 25:29-35
 52. Britten RJ, Kohne DE: Repeated sequences in DNA. *Science* 1968; 161:529-540
 53. Willard HF, Wayne JS: Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *TIG* 1987; 3:192-198
 54. Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ: *In situ*-Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994
 55. Gall JG, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Genetics* 1969; 63:378-383
 56. John HA, Birnstiel ML, Johns KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 223:582-587
 57. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast – evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 1999; 187:396-402
 58. Staats B, Bonk U, Gohla G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Two cases of fibrocystic breast disease with polysomy 18 as the sole clonal cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103:91-94
 59. Fletcher J A, Pinkus G S, Weidner N, Morton C C. Lineage-restricted clonality in biphasic solid tumors. *Am J Pathol* 1991; 138:1199-1207

60. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S: Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67:421-428
61. Dublin EA, Millis RR, Smith P, Bobrow LG: Minimal breast cancer: evaluation of histology and biological marker expression. *Br J Cancer* 1999; 80:1608-1616
62. Rajan PB, Scott DJ, Perry RH, Griffith CD: p53 protein expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42:283-290

Anhang

Bezugsquellen der genannten Chemikalien:

DAKO, Denmark

Maus-anti-Biotin Antikörper (Primärantikörper)

Kaninchen-anti-Maus-Ig Antikörper (Sekundärantikörper)

Ziege-anti-Kaninchen-Ig Antikörper, Peroxidase-konjugiert (Tertiärantikörper)

p53 Antikörper

dianova, Hamburg

MIB 1 Antikörper, monoklonal, gegen das Ki-67 Protein

Appligene Oncor, Heidelberg

Chromosom 1 Midisatellite Probe

Chromosom 7 alpha-Satellite Probe

Chromosom 8 alpha-Satellite Probe

Chromosom 18 alpha-Satellite Probe

Chromosom 20 alpha-Satellite Probe

Sigma

Pepsin, lyophilisiert

NaSCN

APES

Bovines Serum-Albumin

Merck, Darmstadt

Natriumchlorid

Natriumcitrat

1 N Salzsäure

Phosphat-buffered saline Lösung (PBS)

Danksagung

Ich danke den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Claudia Gärtner, Frau Michaela Kapp und Frau Christa Urlaub für die Unterstützung bei den Laborarbeiten. Herrn Dr. German Ott danke ich für die Betreuung im Rahmen der Durchführung und Interpretation der *In situ*-Hybridisierung. Ebenso möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Kristen und Herrn Professor Dr. Johannes Dietl für die Datenerhebung in der Universitätsfrauenklinik danken. Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans Schweisfurth für seine Bemühungen sowie Herrn Prof. Dr. Hans Caffier für die Übernahme des Korreferats. Herrn Professor Dr. Hans-Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Realisation des Projektes innerhalb seines Institutes sowie für die Finanzierung der Arbeit und deren Veröffentlichung. Abschließend möchte meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Justus Müller, für die Initiierung und Betreuung der Arbeit und die große Geduld bei deren Erstellung danken.

Lebenslauf

Christian Kieslich

geboren am 14. Februar 1973 in Bad Kissingen

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule Münnerstadt
1983 – 1992	Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium Münnerstadt
1992 – 1993	Zivildienst am Bezirksfachkrankenhaus Münnerstadt

Studium

1993 – 1998	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1998 – 1999	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin
1.12.1999	Studienabschluß

Berufstätigkeit

2000 – 2001	Arzt im Praktikum am Carl-Thiem-Klinikum in Cottbus
seit 10.7.2001	Assistenzarzt am Carl-Thiem-Klinikum in Cottbus

Cottbus, 16. November 2001