

Früher Verlust der Heterozygotie auf Chromosomenarm 16q in flachen epithelialen Atypien der Brust

Detektion durch Mikrosatellitenanalysen

Aufgrund ihrer Assoziation mit Mikrokalzifizierung wird die flache epitheliale Atypie (FEA, **Abb. 1**) mit zunehmenden radiologischen Mammascreeingprogrammen in Stanz- und Vakuumsaugbiopsien der Brust immer häufiger beobachtet [1, 2]. Obwohl die FEA schwierig von anderen Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms zu unterscheiden ist, gibt es eindeutige Kriterien, die sie in ihrer Morphologie von anderen Kolumnarzellläsionen unterscheidet [3]. Da die FEA öfter mit einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) assoziiert ist, lässt dies die Hypothese zu, dass sie eine Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen könnte [4]. Ein erster Hinweis dafür sind die Ergebnisse zur Zytokeratinexpression in die-

sen Läsionen [5]. Neben der CK-5/6-Negativität ist für den „low grade pathway“ der frühe Verlust des Chromosomenarms 16q typisch [6, 7]. Sollte die FEA ebenfalls gehäuft diesen 16q-Verlust aufweisen, wäre dies ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich um eine Vorläuferläsion des Mammakarzinoms handeln könnte. Daher haben wir eine vergleichende Mikrosatellitenanalyse von 9 Markern an FEAs, DCISs und invasiven Mammakarzinomen durchgeführt, wobei wir die Alterationsfrequenz von 3 verschiedenen Markern auf 16q mit den Markern anderer genomischer Regionen verglichen haben.

Material und Methoden

Insgesamt wurde von 17 Patientinnen eine FEA untersucht. Diese waren assoziiert mit einem DCIS I/II bzw. invasivem Mammakarzinom. Für die vergleichende genetische Mikrosatellitenanalyse wurden zur FEA korrespondierende Gewebeproben von DCISs in 11 Fällen und in 9 Fällen von den dazugehörigen invasiven Mammakarzinomen untersucht. Es wurde eine CK5/6-Immunhistochemie durchgeführt und die Diagnose der FEA durch 2 Pathologen unabhängig voneinander gestellt [8, 9].

Mikrodissektion

Von FEAs, DCISs und invasiven Mammakarzinomen wurden 3–4 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf vorher mit UV-Licht belichtete PEN-Membranen (Polyethylen-Naphthalate-Objektträger) der Firma PALM aufgezogen. Nach einer 2-tägigen Inkubation bei 50°C wurden die Schnitte in Xylol 2-mal 15 min entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe hydriert. Für 5 min wurde eine Hämatoxylinfärbung durchgeführt, gefolgt von einer Eosinfärbung für 15 s.

Die Mikrodissektion erfolgte mittels PALM-Mikrolaser, einem UV-Laser der Wellenlänge 240 nm. Die den Schnitt-

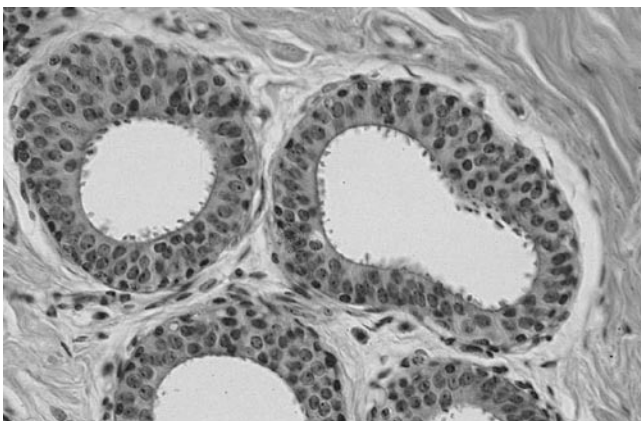


Abb. 1 ◀ Flache epitheliale Atypie (FEA) der Brust (HE-Färbung, Vergr. 400:1)

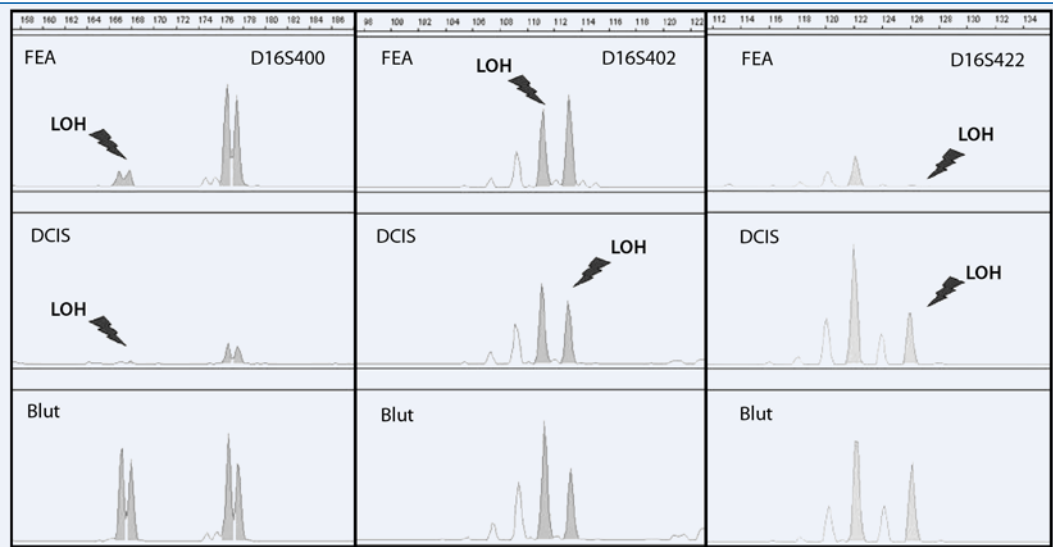


Abb. 2 ► Nachweis genetischer Alterationen (LOH) bei 3 Mikrosatellitenmarkern auf 16q in FEA und DCIS einer Patientin

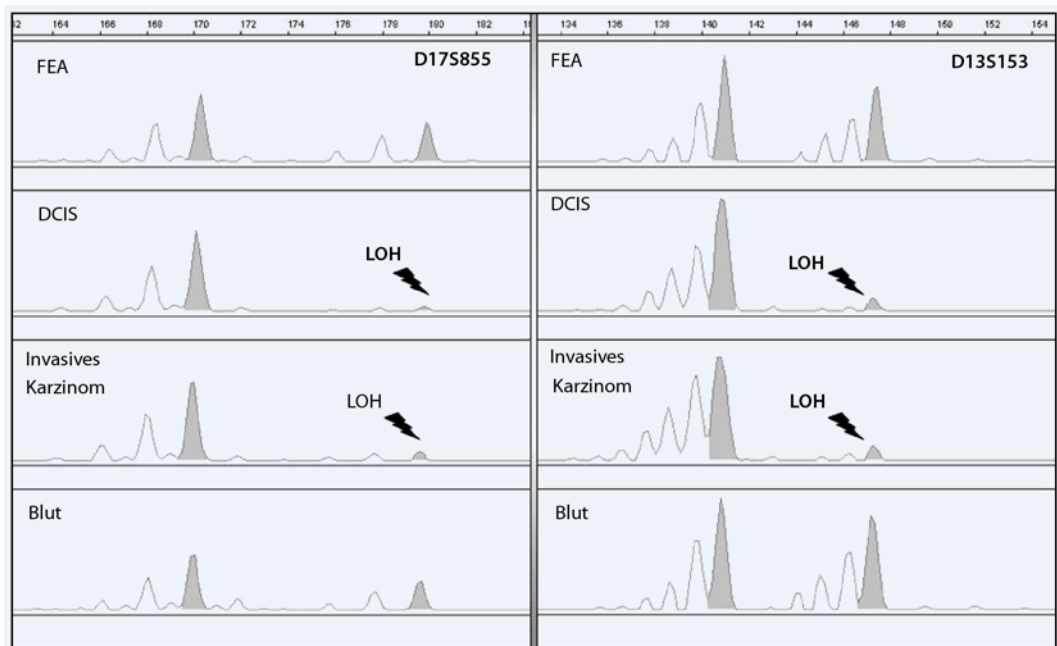


Abb. 3 ► Nachweis genetischer Alterationen (LOH) bei den Mikrosatellitenmarkern D17S855 (BRCA1) und D13S153 (RB1) einer Patientin bei DCIS und invasivem Mammakarzinom, die nicht bei FEA nachweisbar sind

ten unterliegende PEN-Membran ermöglichte die Anwendung der ROBO-LPC-Funktion, bei der ein ausgewähltes Areal der FEA vollständig in das über dem Schnitt positionierte Cap katapultiert wurde [10].

DNA-Isolation

Die unmittelbare Isolation der DNA mittels Quiagen-Microkit erfolgte an 1000–3000 Zellen nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 25 µl AE-Puffer eluiert und bei –20°C bis zur Verwendung in der PCR tiefgefroren.

Mikrosatellitenanalysen

Die 9 durchgeführten Mikrosatellitenanalysen der Marker D7S522, D8S258, NEFL, D10S153, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422 und D17S855 wurden nach den bereits veröffentlichten PCR-Protokollen [11, 12] als 3 Multiplex-PCRs in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die verwendeten Primer, deren zytogenetische Lokalisation sowie die Fragmentlänge sind in **Tab. 1** aufgelistet. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte auf einem ABI PRISM® 3730 DNA Analyser (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Auswertung der Elektrophero-

gramme erfolgte mit der GeneScan Analysis Software 3.7. Die Berechnung des LOH-Scores („loss of heterozygosity“) erfolgte nach Bürger et al. [13].

Resultate

Die höchste genetische Alterationsfrequenz konnte für die 16q-Marker (**Abb. 2**) sowie den D13S153 (RB1) nachgewiesen werden (**Tab. 2**). Insbesondere die Marker D16S400 und D16S402 zeigen im Vergleich mit anderen ausgewählten Markern bei den FEAs wesentlich mehr Alterationen. Damit konnten für die FEAs ähnlich hohe Alterationsfrequenzen für die Marker auf 16q

H. Schmidt · C. Dahrenmöller · K. Agelepoulos · D. Hungermann · W. Böcker **Früher Verlust der Heterozygotie auf Chromosomenarm 16q in flachen epithelialen Atypien der Brust. Detektion durch Mikrosatellitenanalysen**

Zusammenfassung

In einer vergleichenden Mikrosatellitenuntersuchung wurden die Marker D7S522, D8S258, NEFL, D10S153, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422 und D17S855 bei flachen epithelialen Atypien (FEAs), duktalem Carcinoma in situ (DCISs) und invasivem Mammakarzinom auf gemeinsame genetische Alterationen hin untersucht. Das Gewebe für die DNA-Isolation wurde mittels PALM-Mikrolasersertechnik mikrodisssektiert. Dabei zeigte sich für FEAs, dass neben einer hohen Alterationsfrequenz des Markers D13S153 (RB1) v. a. die Marker auf 16q betroffen waren. Andere Marker zeigten eine vergleichbar niedrigere Alterationsfrequenz. Die nachgewiesenen 16q-Alterationen finden sich vergleichbar häufig

ebenfalls bei DCISs und invasiven Karzinomen. Besonders bemerkenswert ist, dass diese 16q-Alterationen bei FEA auch in assoziierten DCISs und invasiven Karzinomen derselben Patientin vorkommen. Da der frühe Verlust von 16q für eine Subgruppe des Mammakarzinoms und deren Pathogeneseweg charakteristisch ist, veranlasste uns dies zu der Annahme, dass die FEA eine Vorläuferläsion des sog. „low grade pathway“ sein könnte.

Schlüsselwörter

16q · Mikrosatellitenanalyse · FEA · DCIS · Brustkrebs

Early loss of heterozygosity on chromosome arm 16q in flat epithelial atypia of the breast. Detection by microsatellite analyses

Abstract

With the improvement of breast carcinoma screening, pre-malignant cell lesions such as flat epithelial atypia (FEA) are detected more frequently. Several studies have demonstrated that FEA show features of a ductal neoplasia, but is it really a precursor lesion? We have started a comparative genetic analysis of a panel of nine microsatellite markers on six different chromosomal regions to investigate whether FEAs show the same characteristic genetic alterations as ductal carcinomas in situ (DCISs) and invasive carcinoma of the breast. FEAs, DCISs and invasive carcinomas of the same patients were microdissected using PALM micro laser technology. DNA was isolated using the QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN). We have investigated a set of the polymorphic microsatellite markers D7S522, D8S258, NEFL, D10S541 (PTEN), D13S153 (RB1), D16S400, D16S402, D16S422 and D17S855 (BRCA1) using multiplex PCR

for the detection of allelic imbalances. Most of the investigated FEAs showed a lower frequency of loss of heterozygosity than associated DCISs or invasive carcinomas. However, we were able to detect the same alterations in FEAs as in DCISs or invasive carcinomas in a number of cases. Notably, the microsatellite marker on 16q showed more prevalent allelic imbalances in FEAs than the other investigated markers. One of the hallmarks in the pathogenesis of a large subgroup of invasive breast carcinomas is the early loss of chromosome arm 16q. In this study, we were able to detect frequent genetic alterations on chromosome 16q in FEAs, associated DCISs and invasive carcinomas. This suggests that FEA is a precursor lesion in the low-grade pathway.

Keywords

16q · Microsatellite analyses · FEA · DCIS · Breast carcinoma

nachgewiesen werden wie für die assoziierten DCISs und invasiven Karzinome (■ **Tab. 1**). Lediglich der Marker D13S153 hat bei den FEAs ebenfalls vergleichbar viele LOHs wie DCISs und die invasiven Karzinome.

Mit Ausnahme der 16q-Marker und D13S153 haben die FEAs im Vergleich zu DCISs und invasiven Karzinomen entweder keine LOHs (■ **Abb. 3**), während DCISs und/oder invasive Karzinome LOHs aufweisen, oder es lassen sich genetische Alterationen nachweisen, die ebenfalls in DCIS und invasivem Karzinom vorkommen. Lediglich beim Marker D13S153 haben die FEAs in 3 Fällen LOHs, die die assoziierten DCISs nicht aufweisen.

Diskussion

Die Untersuchung der flachen epithelialen Atypie gestaltet sich aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen ist erst seit kürzerer Zeit eine exakte Definition festgelegt worden (z. B. [3, 5, 8, 14]). Hinzu kommt, dass ausschließlich formalinfixiertes Gewebe zur Verfügung steht und die FEA im Vergleich zum DCIS oder invasiven Karzinom nur aus sehr wenigen Zellen besteht. So ist die Auswahl der zur Verfügung stehenden genetischen Methoden begrenzt und ohne Mikrodissektion nicht möglich. Bereits in der Vergangenheit konnte mittels Mikrosatellitenanalysen gezeigt werden, dass auch in normalem Mammaepithel bzw. in „präinvasiven Läsionen“ [15, 16, 17] genetische Alterationen nachgewiesen werden konnten. Bei unseren Mikrosatellitenanalysen haben wir ein besonderes Augenmerk auf 16q-Marker gelegt, da im Sinne des Progressionsmodells von Bürger et al. [6] ein früher Verlust des Chromosomenarms 16q charakteristisch ist. Unsere vergleichenden genetischen Analysen zeigten tatsächlich, dass mit einer Ausnahme in allen untersuchten FEAs bereits genetische Alterationen auf 16q nachgewiesen werden konnten, die ebenfalls in den assoziierten DCISs bzw. invasiven Karzinomen auftraten. Dies veranlasste uns zu der Annahme, dass die FEA eine Vorläuferläsion des „low grade pathway“ sein könnte. Da der vorgestellte Untersuchungsumfang begrenzt

ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen, wie häufig dieser 16q-Verlust ist und ob andere Kolumnarzellläsionen ebenfalls diesen Verlust aufweisen.

Korrespondenzadresse

Dr. H. Schmidt

Gerhard Domagk Institut für Pathologie
Molekulare Pathologie
Universitätsklinikum Münster
Domagkstraße 17, 48149 Münster
schmidha@uni-muenster.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Kumaraswamy V, Liston J, Shaaban AM (2008) Vacuum assisted stereotactic guided mammotome biopsies in the management of screen detected microcalcifications: experience of a large breast screening centre. *J Clin Pathol* 61: 766–769
- Pandey S, Kornstein MJ, Shank W, Shaw de Paredes E (2007) Columnar cell lesions of the breast: mammographic findings with histopathologic correlation. *Radiographics (Suppl 1)* 27: 79–89
- Schnitt SJ (2006) Preneoplasia of the breast, flat epithelial atypia. Elsevier, München, pp 370–372
- Oyama T, Maluf H, Koerner F (1999) Atypical cystic lobules: an early stage in the formation of low-grade ductal carcinoma in situ. *Virchows Arch* 435: 413–421
- Böcker W (2006) Preneoplasia of the breast, basic principles of precursor lesions of breast cancer. Elsevier, München, p 340
- Bürger H, Otterbach F, Simon R et al. (1999) Different genetic pathways in the evolution of breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 189: 521–526
- Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K et al. (2002) Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 82: 1525–1533
- Schnitt SJ (2003) The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: flat epithelial atypia – classification, pathologic features and clinical significance. *Breast Cancer Res* 5: 263–268
- Otterbach F, Bänkfalvi A, Bergner S et al. (2000) Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology* 37: 232–240
- Niyaz Y, Stich M, Sägmüller B et al. (2005) Noncontact laser microdissection and pressure catapulting: sample preparation for genomic, transcriptomic, and proteomic analysis. *Methods Mol Med* 114: 1–24
- Schmidt H, DeAngelis G, Eltze E et al. (2006) Asynchronous growth of prostate cancer is reflected by circulating tumor cells delivered from distinct, even small foci, harboring loss of heterozygosity of the PTEN gene. *Cancer Res* 66: 8959–8965
- Agelopoulos K, Tidow N, Korsching E et al. (2003) Molecular cytogenetic investigations of synchronous bilateral breast cancer. *J Clin Pathol* 56: 660–665
- Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H et al. (2003) Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *J Clin Pathol* 56: 660–665
- World Health Organisation (2003) Classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, pp 65–66
- Reis-Filho JS, Lakhani SR (2003) The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions. *Breast Cancer Res* 5: 313–319
- Euhus DM, Cler L, Shivapurkar N et al. (2002) Loss of heterozygosity in benign breast epithelium in relation to breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 94: 858–860
- Moinfar F, Man YG, Brattauer GL et al. (2000) Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type („clinging ductal carcinoma in situ“): a simulator of normal mammary epithelium. *Cancer* 88: 2072–2081

Tab. 1 Primersequenzen, zytogenetische Lokalisation und Fragmentlänge der verwendeten Mikrosatellitenmarker auf 7q, 8p, 10q, 16q und 17q

Primer-Locus	Primersequenzen	Zytogenetische Lokalisation	Erwartete Fragmentlänge (bp)
D7S522	5'-Fam-GCA GGA CAT GAG ATG ACT GA-3' 5'-GTT ATG CCA CTC CCT CAC AC-3'	7q31.1	116–126
D8S258	5'-Fam-AGC TGC CAG GAA TCA ACT GAG AG-3' 5'-GAT GCT CAC ATA AAG GAG GGA GG-3'	8p22	216–230
NEFL	5'-Fam-CC AAT ACCTGC AGT AGT GCC-3' 5'-GAG CTG CTT AAC ACA TAG GG-3'	8p21	97–105
D10S153 (PTEN)	5'-Fam-CAC CAC AGA CAT CTC ACA ACC-3' 5'-CCA GTG AAT AGT TCA GGG ATG G	10q23	153–175
D13S153 (Rb1)	5'-Fam-AG GGT TAT GTA TAA CCG ACT CC-3' 5'-Fam-GTC TAA GCC CTC GAG TTG TGG-3'	13q14.2	170–190
D16S400	5'-Fam-GGT TCA CAA TTG GAC AGT AT-3' 5'-GAA CCC TCC ATG CTG ACA TT-3'	16q22.2–23.1	165–179
D16S402	5'-Fam-GT ACC CAT GTA CCC CCA ATA-3' 5'-CAA AGC ACC ACA TAG ACT AA-3'	16q24.2	110–120
D16S422	5'-Joe-GAG AGG AAG GTG GAA ATA CA-3' 5'-GTT TAG CAG AAT GAG AAT AT-3'	16q24.2	105–129
D17S855 (BRCA1)	5'-Fam-GG ATG GCC TTT TAG AAA GTG G 3' 5'-ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC-3'	17q21	139–153

Hinweis

Bitte beachten Sie auch **Tabelle 2** auf der folgenden Seite.

Tab. 2 Detektierte genetische Alterationen (LOH) bei FEA, DCIS und invasivem Mammakarzinom (Inv. CA) bei 17 Patientinnen

Fall	Läsion	D7S522	D8S258	NEFL	PTEN	D13S153	D16S400	D16S402	D16S422	D17S855	LOH ges	LOH 16q
1	FEA	●	●	●	■	○	●	○	○	■	3	2
	DCIS	●	●	●	■	■	●	○	○	■	2	2
2	FEA	○	○	●	○	■	○	○	○	■	6	3
3	FEA	○	■	○	◇	■	■	◇	○	○	4	1
	Inv.CA	○	○	○	◇	■	○	○	○	○	7	3
4	FEA	◇	●	●	●	○	○	■	○	○	4	2
	Inv.CA	◇	●	●	●	■	○	○	○	○	4	3
5	FEA	○	●	●	○	○	■	◇	○	■	4	1
6	FEA	○	●	■	○	○	○	○	○	■	6	3
7	FEA	●	●	●	●	○	○	●	○	■	3	2
	DCIS	●	●	●	●	■	○	●	○	○	3	2
8	Inv.CA	●	●	●	●	■	○	■	○	●	2	2
	DCIS	●	●	●	●	■	○	■	○	●	2	2
	FEA	●	●	●	●	■	■	○	■	●	1	1
9	DCIS	●	○	●	○	○	○	○	○	○	7	3
	FEA	●	○	●	■	○	○	○	○	◇	5	3
	Inv.CA	●	○	●	■	○	■	■	○	■	3	1
10	FEA	○	■	●	●	■	○	■	○	■	3	2
	DCIS	○	■	●	●	■	■	○	○	■	3	2
11	FEA	◇	○	●	○	○	■	■	■	○	4	0
	DCIS	◇	◇	◇	○	◇	◇	■	■	◇	1	0
	Inv.CA	■	○	●	○	○	■	■	■	■	3	0
12	FEA	■	■	●	●	■	■	○	○	■	2	2
	DCIS	■	■	●	●	○	○	■	○	■	3	2
13	FEA	●	■	●	●	■	○	○	○	■	3	3
	DCIS	●	○	●	●	○	○	○	○	○	6	3
	Inv.CA	●	○	●	●	○	○	○	○	○	6	3
14	FEA	●	○	●	●	○	○	●	○	○	5	2
	DCIS	●	■	●	●	◇	○	●	○	◇	2	2
	Inv.CA	●	○	●	●	○	○	●	○	○	5	2
15	FEA	■	■	○	●	○	●	○	○	○	5	2
	DCIS	◇	○	○	●	○	●	○	○	○	6	2
16	FEA	●	○	●	○	■	○	■	■	■	3	1
	DCIS	●	○	●	○	■	○	■	○	■	4	2
	Inv.CA	●	○	●	○	○	○	○	○	■	6	3
17	FEA	○	●	●	●	○	○	■	○	■	4	2
	Inv.CA	○	●	●	●	○	○	○	○	○	6	3

Legende: ○ LOH, ● nicht informativ (homozygot), ■ kein LOH, ◇ nicht verfügbar