

Aus dem Pathologischen Institut der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Kirchner

Her-2/neu-Genamplifikation und Topoisomerase-II- $\alpha$ -  
Amplifikation und Deletion als prädiktive Marker beim  
Mammakarzinom

Umfassende retrospektive Analyse mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-  
Hybridisierung (FISH)

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Jennifer Maria Schiffers

aus  
München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Diebold

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Darius Dian

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. D. Mayr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2011

*Meinem Bruder.*

*Meinen Eltern.*



# Inhaltsverzeichnis

Einleitung .....	1
Diagnose des Mammakarzinoms .....	2
Mikroskopische Beurteilung der Operationspräparate.....	4
Histologische Differenzierung und weiterführende pathologische	
Diagnostik des Mammakarzinoms.....	5
Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$ .....	13
Therapie des Mammakarzinoms .....	17
Zielsetzung und Fragestellung.....	19
Material und Methoden .....	19
Patientenkollektiv .....	20
Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) des Her-2/neu-Gens .....	26
Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens	29
Auswertung der FISH-Präparate.....	29
Immunohistochemie .....	32
Statistische Auswertung.....	33
Ergebnisse.....	34
Ergebnisse der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	35
Darstellung der verschiedenen Amplifikationsgrade laut FISH .....	38
Ergebnisse der Immunohistochemie .....	43
Korrelationen .....	44
Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$ .....	44
Her-2/neu und Immunohistochemie.....	46
Amplifikation und prognostisch relevante Faktoren .....	48

Histologischer Subtyp .....	48
TNM-Klassifikation.....	51
pT-Stadium.....	51
pN-Stadium.....	53
M-Stadium.....	57
Grading .....	60
Darstellung der unterschiedlich amplifizierten Fälle .....	61
Überlebensanalysen .....	66
Allgemeine Überlebenskurve.....	66
Überleben in Abhängigkeit vom Amplifikationsstatus .....	68
Überlebensanalyse unter Berücksichtigung der durchgeführten Therapie .....	70
Diskussion .....	72
Immunohistochemie versus Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	72
Zusammenhang zwischen Amplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$ .....	75
Die koamplifizierten Fälle.....	77
Die nicht amplifizierten Fälle .....	81
Die unterschiedlich amplifizierten Fälle.....	82
Literaturverzeichnis .....	87
Zusammenfassung.....	96
Danksagung .....	101

# Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland stellt das Mammakarzinom mit jährlich etwa 60000 Neuerkrankungen die häufigste bösartige Erkrankung der Frau dar. Diese Zahlen gelten für den Großteil der westlichen Welt, wobei vor allem Frauen mit weißer Hautfarbe betroffen sind. Frauen mit schwarzer Hautfarbe erkranken weniger häufig. An dieser Krebserkrankung sterben in Deutschland pro Jahr etwa 16.500 Frauen (Statistisches Bundesamt, Stand 2006), weltweit beläuft sich diese Zahl auf circa 370.000 Todesfälle. Damit belegt das Mammakarzinom den zehnten Platz der häufigsten Todesursachen insgesamt in der Bundesrepublik und rangiert, nach Geburten und Herzinsuffizienz, auf dem dritten Platz der Hauptdiagnosen für die stationäre Aufnahme bei Frauen (Statistisches Bundesamt, 2006). Das Gesamtlebenszeit-Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, beträgt derzeit 12% (Kreienberg et al., 2008). Das heißt, dass mehr als jede zehnte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken wird. Jedoch tritt diese bösartige Erkrankung nicht allein bei Frauen auf; auch Männer können betroffen sein. Sie stellen 1% der diagnostizierten Fälle. Das Mammakarzinom gilt längst nicht mehr als Erkrankung der alten Frau: Mit einem mittleren Manifestationsalter von 62 Jahren (Kreienberg et al., 2008) ist das Mammakarzinom eine Erkrankung, die in jedem Lebensabschnitt auftreten und Frauen jeden Alters betreffen kann. Betroffene Frauen sind jedoch sehr selten bei Diagnosestellung jünger als 35 Jahre.

Für einen Teil der Karzinomfälle sind genetische Prädispositionen verantwortlich, die ein Auftreten eines Mammakarzinoms im Laufe des Lebens hochwahrscheinlich machen. Dabei handelt es sich am häufigsten um das BRCA-1-Gen (*breast-cancer-Gen*) mit einem Gesamtlebenszeit-Risiko für eine Erkrankung von etwa 90%. Auch andere Genkonstellationen können zu einem erhöhten Risiko für Brustkrebs führen. Darüber hinaus sei jedoch auch erwähnt, dass frühe Geburten, Stillen, sportliche Aktivität und Verzicht auf langjährige Hormonsubstitution im Klimakterium protektiv wirken können (Haag et al., 2006).

## **Diagnose des Mammakarzinoms**

Für das Mammakarzinom wird geschätzt, dass etwa 50% der Patientinnen bei Erstmanifestation bereits Metastasen aufweisen. Daher ist eine möglichst frühe Diagnosestellung von zentraler Bedeutung. Die Teilnahme an Mammographie-Screenings macht eine Entdeckung der Erkrankung bereits bei kleinerer Tumorgröße möglich. Es ist gezeigt worden, dass es dadurch sekundär zu einer Senkung der Sterblichkeit kommt (Michaelson et al., 2003). Bereits Tumoren mit einer Größe von 5 mm sind in der Mammographie darstellbar. Neben dem Screening hat auch die manuelle Abtastung der Brust durch den Gynäkologen und die Frau selbst einen hohen Stellenwert in der Früherkennung von Brustkrebs. Ergibt sich hierbei ein auffälliger Befund, ist eine röntgenologische beziehungsweise sonographische Abklärung anzuraten und durchzuführen. Darüber hinaus ergibt sich vor



allem aus dem Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel eine weitere Möglichkeit zur Diagnosestellung und Operationsplanung (Kreienberg et al., 2008). Eine endgültige Bestätigung der Diagnose erfolgt durch die Stanz- und Vakuumbiopsie mit histologischer Begutachtung.

Neben den oben genannten diagnostischen Mitteln hat heutzutage auch die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie einen hohen Stellenwert beim Staging des Mammakarzinoms. Diese Untersuchung gehört zur klinischen Routine und wird intraoperativ durchgeführt. Als Sentinel-Lymphknoten (auch Wächterlymphknoten) bezeichnet man den Lymphknoten, den metastasierende Zellen eines Primärtumors als ersten über den Lymphabfluss erreichen. Genannter Lymphknoten wird farbmarkiert und kann so leicht erkannt und entnommen werden sowie im Schnellschnitt histologisch begutachtet werden. Weist er metastatische Veränderungen auf, ist eine Metastasierung der axillären Lymphknoten möglich, die dann operativ mitentfernt werden müssen. Studien haben gezeigt, dass die Technik der Sentinel-Lymphknoten-Biopsie etwa zwei Drittel der Patientinnen eine Axilladisektion ersparen kann und dennoch ein zuverlässiges Staging bietet (Christiansen et al., 2008).

Als letzter Schritt der Diagnosestellung – und gleichzeitig als therapeutische Intervention – gilt die Operation mit Entnahme des Tumors. Die entnommenen Proben werden durch den Pathologen begutachtet und weiteren Analysen unterzogen.

## Mikroskopische Beurteilung der Operationspräparate

Gemäß der S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Kreienberg et al., 2008) muss die vom Pathologen durchgeführte Begutachtung des OP-Präparates folgende Punkte einschließen:

- Seitenangabe, Art der Probe und wesentliche pathologische Veränderungen
- nähere Angaben zum entnommenen Tumor. Dazu gehören Histologie, Grading (nach WHO) bei *Ductalen Carcinoma in situ* (DCIS) und invasiven Karzinomen, Tumorgroße, Ausdehnung eines eventuellen intraduktalen Anteils des Karzinoms, Resektionsrand, Klassifizierung von Tumor, Nodalstatus und Metastasen (TNM) und eventuelle Gefäßinvasion.
- Angaben weiterer unter Umständen vorhandener Tumorherde im Sinne einer Multifokalität oder Multizentrität
- Bei invasiven Karzinomen erfolgt die Angabe des Her-2/neu-Status, der in der Immunohistochemie ermittelt wurde.
- Mikrokalzifikationen bedürfen einer näheren Beschreibung.

## **Histologische Differenzierung und weiterführende pathologische Diagnostik des Mammakarzinoms**

In der Pathologie werden vor allem zwei grosse Gruppen von Mammakarzinomen unterschieden, die sich beide von der terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE) ableiten, jedoch phänotypisch und auf molekularer Ebene differieren.

Das *invasiv duktales* Karzinom ist das am häufigsten vorkommende Karzinom und macht etwa 85% der Mammakarzinome aus. Es wächst von den Milchgängen ausgehend und kann in der Mammographie sternförmige Ausläufer aufweisen. Makroskopisch präsentiert es sich in unterschiedlichen Formen, mikroskopisch hat der Tumor die Basalmembran durchbrochen und es können sowohl solide als auch drüsige Tumorzellverbände vorhanden sein.

Das *invasiv lobuläre* Karzinom wächst von den Drüsenläppchen ausgehend und macht etwa 10% der Fälle aus. Wesentlich häufiger als das *invasiv duktales* Karzinom, tritt diese Form des Mammakarzinoms bilateral auf. Tumorzellen in Einzelzellreihen ergeben das Bild des „Indian line pattern“ oder, wenn sie konzentrisch angeordnet sind, des Schießscheibenmusters. Die Tumorzellen sind eher kleiner als beim duktales Karzinom. Zwar können die Tumorzellen eine PAS (Periodic-acid-Schiff)-Positivität aufweisen, sie bilden jedoch keine Drüsenlumina. Auf molekularer Ebene

beruht das Wachstumsmuster auf einem Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin.

Darüber hinaus sei das *tubuläre Karzinom* erwähnt, das lediglich hoch differenzierte galnduläre Elemente aufweist und einreihige Epithelproliferationen zeigt. Es geht mit einer relativ guten Prognose einher und metastasiert seltener.

Das *medulläre Karzinom*, das mit einer ausgeprägten Lymphozyteninfiltration vergesellschaftet ist, ist ein gut abgrenzbarer Tumor mit in der Regel günstiger Prognose.

Das *muzinöse Karzinom* sezerniert Schleim in den intra- und extrazellulären Raum. Dabei bilden sich typischerweise Siegelringzellen. Prognostisch ist dieser Subtyp günstig.

Bei den nicht invasiv wachsenden Formen sei zuerst das *duktale Carcinoma in situ (DCIS)* erwähnt. Dieses breitet sich innerhalb von ausgeweiteten Ducti lactiferi aus. Die Basalmembran bleibt hierbei erhalten. Die Tumorzellen wachsen solide, drüsig oder papillär. Wenn sich erstere wie Mitesser aus dem Ganglumen drücken lassen, spricht man auch von einem *Komedokarzinom*. Diese Komedonekrosen können sekundär kalzifizieren. Es finden sich überwiegend große Tumorzellen, Mikroverkalkungen und Kalkstraßen. Diese werden auch in der Mammographie sichtbar. Die Zellen

können ein kribriiformes (siebartiges) Wachstumsmuster aufweisen. Nach vollständiger operativer Entfernung gilt die Prognose hier als äußerst gut.

Das *lobuläre Carcinoma in situ (LCIS)* manifestiert sich primär in den Drüsenläppchen. Diese sind teilweise ausgefüllt mit soliden Proliferaten aus atypischen nicht kohäsiven Zellen. Diese weisen einen Expressionsverlust von E-cadherin auf. Die Basalmembran ist auch hier erhalten. Charakteristisch ist ein multizentrisches Wachstum.

Darüber hinaus seien noch das *papilläre Karzinom* sowie das *adenoid-zystische Karzinom* erwähnt. Für das erstere ist die submamilläre Lage charakteristisch, beim zweiten handelt es sich um einen Tumortyp, der sonst vor allem in den Speicheldrüsen auftritt. Die Tumorzellen sind hierbei monomorph und klein und mukoides Material kann die drüsenartigen Hohlräume ausfüllen.

Neben dem eigentlichen Tumor werden von dem Pathologen auch die möglicherweise entnommenen Lymphknoten untersucht. In jedem Fall aber wird der Sentinel-Lymphknoten begutachtet. Hierbei wird nach eventuell vorhandenen Tumorzellen in den Knoten gesucht. Darüber hinaus obliegt es dem Pathologen, den Tumor nach der TNM-Klassifikation zu stagen und das Grading festzulegen. Das Augenmerk bei der TNM-Klassifikation richtet sich auf Tumor, Nodalstatus und Fern-Metastasierung. Die Einstufung erfolgt aufgrund der vorgefundenen Befunde im vom Operateur entnommenen Gewebe. Die einzelnen Stadien bezüglich des Tumors (T) definieren sich nach Singletary et al. (2002) wie folgt:

- pTx: keine Beurteilung des Primärtumors möglich
- pT0: kein Primärtumor
- pTis: Primärtumor entspricht einem Carcinoma in situ
- pT1a: größter Durchmesser des Tumors  $\geq 0,5$  cm
- pT1b: größter Tumordurchmesser zwischen 0,5 und 1,0 cm
- pT1c: größter Durchmesser größer als 1,0 cm, aber weniger als 2,0 cm
- pT2: der Durchmesser des Tumors beträgt mehr als 2,0 cm, aber weniger als 5,0 cm
- pT3: der größte Durchmesser liegt bei mehr als 5,0 cm
- pT4: Infiltration von Brustwand oder Haut durch einen Tumor, ungeachtet seiner Größe
- pT4a: ein Primärtumor jeglicher Größe infiltriert die Brustwand
- pT4b: ein Primärtumor jeglicher Größe führt zu Ödembildung (Peau d'orange eingeschlossen), Ulzerationen oder Satellitenmetastasen der Haut der ipsilateralen Brust
- pT4c: 4a + 4b
- pT4d: inflammatorischer Primärtumor jeglicher Größe

Einen ebenso relevanten Prognosefaktor wie die Tumorgöße stellt der Nodalstatus der Patientinnen dar. Er dient zur Beurteilung von regionären, intraoperativ entfernten Lymphknoten bei malignen Erkrankungen. Die entnommenen Lymphknoten werden auf Tumorgewebe untersucht und, je nach Ergebnis, in verschiedene Stadien eingeteilt. Der Einteilung der in dieser Untersuchung vorliegenden Fälle liegt *jeweils die zum Diagnosezeitpunkt geltende pN-Klassifikation* zugrunde.

- pNX: keine Beurteilung möglich durch fehlende Entnahme von Lymphknoten oder fehlen ebenjener
- pN0: regionäre Lymphknoten nicht metastasiert
- pN1a: Mikrometastasen vorhanden, welche nicht größer als 0,2 cm sein dürfen
- pN1b: Befall von Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna, mikroskopisch darstellbar, jedoch bei der Sentinellymphknotenbiopsie nicht auffällig
- pN1bi: 1 – 3 ipsilaterale (axilläre) Lymphknoten befallen, mindestens eine Lymphknotenmetastase ist größer als 2,0 mm, aber kleiner als 20 mm
- pN1bii: vier oder mehr befallene Lymphknoten, mindestens eine Lymphknotenmetastase ist größer als 2,0 mm, aber kleiner als 20 mm
- pN1biii: Lymphknotenmetastasen dehnen sich über die Kapsel des Lymphknotens hinaus aus, alle sind aber kleiner als 20 mm
- pN1biv: Lymphknotenmetastasen sind größer als 20 mm
- pN1c: 1a + 1b
- pN2: 4 – 9 fixierte befallene Lymphknoten in der ipsilateralen Axilla oder klinisch auffällige Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Fehlen von befallenen axillären Lymphknoten
- pN3: mehr als 10 regionäre Lymphknoten befallen, oder Ausbreitung der Metastasierung in die ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (N3a), oder Metastasen entlang der ipsilateralen A. mammaria interna plus Befall der axillären Lymphknoten (N3b), oder metastasierte supraklavikuläre Lymphknoten ipsilateral (N3c)

Neben den Gesichtspunkten *Tumor* und *Nodalstatus*, ist für TNM-Klassifikation auch relevant, ob bereits eine Fernmetastasierung vorliegt. Auch nur mikroskopisch erkennbare Metastasierungen werden als positiv bewertet. Als Fernmetastasen werden alle Gewebsveränderungen bezeichnet, die nicht im pN-Stadium erfasst wurden. M0 bedeutet keine Fernmetastasierung, M1 jedoch zeigt eine vorhandene Fernmetastasierung an.

Zusammenfassend lassen sich die einzelnen Teilaspekte der TNM-Klassifikation vereinen und in vier Stadien zusammenfassen (Tabelle 1). Diese wurden von der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) definiert:

**Tabelle 1**

Stadium nach UICC	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III	T1-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
	T4	N0-2	M0
	Alle	N3	M0
IV	Alle	Alle	M1



Auch das Grading, welches den Grad der Zelldifferenzierung im Tumor beschreibt, stellt einen wichtigen Prognosefaktor des Mammakarzinoms dar. Eine Einteilung erfolgt nach dem Nottingham Grading System, welches von Elston und Ellis etabliert wurde. Unterschieden werden die Grade G1 bis G3, welche sich aus einer ermittelten Punktsomme (Score) ergeben. Bewertet werden die Tubulusbildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate pro Gesichtsfeld. Bezüglich der Tubulusbildung erfolgt folgende Punktevergabe: Tubulusbildung in über 75% des Präparates ergibt einen Punkt, Tubuli in 10-75% des Tumors wird mit 2 Punkten bewertet und Tubulusbildung in weniger als 10% des untersuchten Gewebes ergibt 3 Punkte. Die Kernpolymorphie betreffend wird unterschieden zwischen einheitlich kleinen regulären Zellen (1 Punkt), moderate Kerngröße mit Variationen (2 Punkte) und großer Variation (3 Punkte). Schließlich werden noch die Mitosen pro Gesichtsfeld beurteilt. 0 bis 9 Mitosen ergeben 1 Punkt, 10 bis 19 Mitosen 2 Punkte und ab 20 Mitosen pro Gesichtsfeld werden 3 Punkte vergeben. Aus allen drei bewerteten Kriterien wird schließlich eine Summe errechnet, aus der sich das Grading ergibt:

- Grad 1 (low grade) liegt dann vor, wenn eine Punktsomme von 3 bis 5 Punkten vorliegt. Es ist von gut differenziertem Tumorgewebe auszugehen.
- Grad 2 (intermediate grade) liegt bei einem Score von 6 bis 7 Punkten vor.
- Grad 3 (high grade) setzt das Erreichen von 8 bis 9 Punkten voraus, es ist von einem schlecht differenzierten Tumorgewebe auszugehen.

Abgesehen von oben erwähnten existieren noch weitere Einteilungsschemata. Eines davon ist die St. Gallener-Risikoeinteilung. Diese wird alle zwei Jahre auf dem Konsensustreffen in St. Gallen aktualisiert, zuletzt 2007. Durch die Einteilung in Risikogruppen soll eine adäquatere Therapie, entsprechend dem Risikoprofil jeder einzelnen Patientin, erreicht werden. Jener Empfehlung von 2007 folgend werden drei Risikogruppen unterschieden (Kongressbericht: St Gallen Konsensuskonferenz 2007).

**niedriges Risiko (low-risk-Karzinom)**

- pN0
- maximale Tumorgröße 2 cm
- Grading: G1 (hoch differenziert)
- keine Gefäßinvasion
- negativer Her-2/neu-Status
- positiver Hormonrezeptorstatus (Östrogen und Progesteron)
- die Patientin ist nicht jünger als 35 Jahre

**mittleres Risiko (medium-risk-Karzinom)**

- pN0
- sowie Vorliegen *eines* der folgenden Kriterien:
- maximale Tumorgröße überschreitet 2 cm
  - Grading: G2 bis G3 (mäßig bis schlecht differenziert)
  - Gefäßinvasion liegt vor
  - positiver Her-2/neu-Status
  - die Patientin ist älter als 35 Jahre
- oder*
- positiver Nodalstatus (pN1 bis pN3) und
  - negativer Her-2/neu-Status

**hohes Risiko (high-risk-Karzinom)**

- positiver Nodalstatus (pN1 bis pN3)
  - positiver Her-2/neu-Status
- oder
- positiver Nodalstatus bei mehr als vier Lymphknoten

Diese Einteilung nach Risikogruppen ermöglicht die Erstellung des für jede Patientin besten Therapiekonzeptes, da sie neben der TNM-Klassifikation und dem Tumorgrading auch den Her-2/neu- und Hormonrezeptorstatus enthält.

Nach dem TNM Staging und dem Grading, wird auch der Her-2/neu-Status erhoben. Dies kann zunächst mittels Immunohistochemie erfolgen. Hierbei sind vier Ergebnisse möglich: 0 und 1+ bedeuten einen negativen Her-2/neu-Status, 3+ einen positiven. Das Ergebnis 2+ bezeichnet einen unklaren Status und verlangt eine Abklärung mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), die den Nachweis einer Her-2/neu-Amplifikation ermöglicht. Auch die Ermittlung des Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) des Tumors muss regelmäßig durchgeführt werden, da dies für Therapieentscheidungen relevant ist.

## **Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$**

Seit mehreren Jahren hat die Bestimmung des Her-2/neu-Status einen hohen Stellenwert in der Diagnostik des invasiven Mammakarzinoms und zieht therapeutische Konsequenzen nach sich. Zur klinischen Routine gehört

daher die Ermittlung des Status via Immunohistochemie und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Her-2/neu ist ein membranständiger Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 liegt (17q11.2-q12) lokalisiert ist und der zur Familie der Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR, epidermale Wachstumsfaktoren) gehört. Her2/neu, das zu den Protoonkogenen gezählt wird, stimuliert Zellwachstum und – differenzierung. In 20-30% der Mammakarzinome ist eine Überexpression von Her-2/neu nachweisbar. Mehrere Studien haben belegt, dass diese Überexpression (beziehungsweise Amplifikation) mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Egervari et al., 2008, Fritz et al., 2005).

Topoisomerase-II- $\alpha$  wird erst seit wenigen Jahren im Zusammenhang mit Tumoren der weiblichen Brust erforscht. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, dessen Gen ebenfalls auf dem langen Arm des Chromosoms 17 liegt und das in gesunden Zellen vorrangig in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird. In-vitro-Analysen an Malignomzellen haben gezeigt, dass die Expression in transformierten Zellen nicht mehr strikt an den Zellzyklus gebunden ist (Kalogeraki et al., 2005). Das Enzym führt Doppelstrangbrüche in die DNA ein und lockert damit deren Helix-Windungen auf. Die Topoisomerase-II- $\alpha$  ist der Angriffspunkt für Anthracycline, die in der Therapie des Mammakarzinoms eine große Rolle spielen. Diese binden an das Enzym und hemmen so die Zellteilung. Zudem wird davon ausgegangen, dass der Topoisomerase-II- $\alpha$  eine Bedeutung bezüglich der Prognose von Patientinnen mit Mammakarzinom zufällt. Eine Amplifikation tritt bevorzugt bei aggressiveren Formen des Karzinoms auf und geht häufig mit einer Her-2/neu-Amplifikation und einem positivem

Nodalstatus einher (Koren et al., 2004; Kalogeraki et al., 2005; Depowski et al., 2000).

Aufgrund der topographischen Nähe der beiden Gene (17q12-q21) auf dem langen Arm des Chromosoms 17 ist der Zusammenhang der beiden Marker ein interessanter Bereich für die Forschung auf dem Gebiet des Mammakarzinoms. Jedoch gibt es derzeit kein einheitliches Bild, was die Beziehung dieser Marker zueinander betrifft. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Topoisomerase-II- $\alpha$  zumeist an eine Amplifikation von Her-2/neu gebunden zu sein scheint. Eine englische Arbeitsgruppe berichtete, dass in der Gruppe von Patientinnen mit Her-2/neu amplifizierten Tumoren diejenigen besser auf die Anthracyclintherapie ansprachen, die auch eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation boten. Dies ging mit einem längeren Gesamtüberleben und einem längeren rezidivfreien Überleben einher (Arriola et al., 2007).

Derzeit wird die Indikation zur anthracyclinhaltigen Polychemotherapie in der Regel ohne Untersuchung des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikationsstatus gestellt. Während Anthracycline an der Topoisomerase-II- $\alpha$  angreifen, ist Her-2/neu die Zielstruktur für den monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Trastuzumab bindet an den Her-2/neu-Rezeptor und wird nur bei nachgewiesener Her-2/neu-Überexpression bzw. Amplifikation verordnet.

Trotz der Tatsache, dass Anthracycline direkt auf die Topoisomerase-II- $\alpha$  wirken, ist noch nicht abschließend geklärt, ob eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -

Amplifikation oder –Deletion einen Vor- beziehungsweise Nachteil auf die Wirkung dieser Chemotherapeutika hat, was beides beim Mammakarzinom eine Rolle spielen könnte (Mano et al., 2007). Eine umfangreiche dänische Studie untermauert diese Annahmen und zeigt auf, dass Patientinnen, die eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation aufwiesen und mit dem Anthracyclin Epirubicin behandelt wurden, eine bessere Prognose hatten als jene Patientinnen ohne Amplifikation. Jedoch deutet diese Studie auch an, dass Deletionen im Bereich der Topoisomerase-II- $\alpha$  mit einem schlechten Verlauf einhergehen (Nielsen et al., 2008). Neben Studien, die beschreiben, dass eine Amplifikation von Topoisomerase-II- $\alpha$  oder Her-2/neu einen Nutzen für die Wirksamkeit einer durchgeführten Chemotherapie gibt, existieren auch gegenteilige aktuelle Mitteilungen, beziehungsweise Studien, die zu keinem eindeutigen Ergebnis gekommen sind (Pritchard et al., 2008; Villman et al., 2008). Nach wie vor sind also die Verhältnisse ungeklärt und es besteht Bedarf für weitere Untersuchungen, um die bislang vorliegenden Daten zu bestätigen oder zu widerlegen.

Zu Beginn dieses Abschnittes wurde bereits erwähnt, dass sowohl das Gen für Her-2/neu, als auch dasjenige für Topoisomerase-II- $\alpha$ , auf dem langen Arm des Chromosoms 17 liegen. Es handelt sich hierbei um das Amplikon 17q12-q21. Von Tumoren, die sowohl eine Her-2/neu-Amplifikation, als auch eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation aufwiesen, wurden in einer Studie diese Amplikone näher untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Smallest Region of Amplification (SRA), in der *beide* Gene enthalten waren, 1,8 Mb groß war. Neben Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  kodiert diese Region

noch für multiple andere Moleküle, die für die Therapie und Prognose des Mammakarzinoms interessant sein könnten (Arriola et al., 2008).

## **Therapie des Mammakarzinoms**

Die Therapie des Mammakarzinoms kann entweder kurative oder palliative Absichten verfolgen. Generell wird ein kurativer Behandlungsansatz angestrebt, dies ist jedoch nicht immer möglich. Der erste Schritt der Therapie besteht meist in der Operation. Ziel dabei ist die komplette Resektion des Tumorgewebes möglichst im Rahmen einer brusterhaltenden Operation. Die vollständige Ablatio mammae wird seltener durchgeführt. Darüber hinaus erfolgt die Entfernung des Sentinel-Lymphknotens und, je nach Bedarf, der regionären Lymphknotenstationen. Operationen der Mamma werden meist von rekonstruierenden Eingriffen gefolgt, um wieder ein symmetrisches Bild der Mammae zu erreichen. Die sich an die Operation anschließende Therapie richtet sich nach der St. Gallener-Risikostratifizierung. So ist bei Patientinnen mit einem low-risk-Karzinom eine adjuvante Chemotherapie nicht indiziert. Empfohlen wird die Durchführung einer Hormontherapie. Standardmäßig wird zu diesem Zweck der Wirkstoff Tamoxifen verwendet. Dieser wird in der Regel über fünf Jahre verabreicht. Auch Aromatasehemmer, die die Umwandlung von Testosteron in Östradiol blockieren, kommen zum Einsatz, besonders bei postmenopausalen Patientinnen. Bei beiden anderen Risikogruppen ist eine adjuvante Chemotherapie leitliniengerecht durchzuführen. Eine

Hormontherapie erfolgt darüber hinaus bei allen Mammatumoren mit positiven Hormonrezeptorstatus.

Bei der eingesetzten Chemotherapie handelt es sich um eine Polychemotherapie verschiedener Schemata. Das am häufigsten verwendete Therapie-Schema besteht aus 5-Fluoruracil plus ein Anthracyclin plus Cyclophosphamid. Je nach Anthracyclin handelt es sich um das FEC- (mit Epirubicin) oder das FAC- (mit Adriamycin = Doxorubicin) Schema. Anthracycline binden an die Topoisomerase-II- $\alpha$ . Darüber gibt es die Möglichkeit, das 5-Fluoruracil durch ein Taxan zu ersetzen. Dies hat sich vor allem für Patientinnen mit Lymphknotenbefall und negativem Hormonrezeptorstatus bewährt (Kreienberg et al., 2008). Ein weiteres wirksames Medikament für Patientinnen mit Her-2/neu überexprimierenden Tumoren stellt der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) dar. Meist wird er nach stattgefundener Chemotherapie verabreicht, kann aber auch mit einem Taxan kombiniert vor jeglicher Chemotherapie gegeben werden. Dieser Antikörper, der intravenös verabreicht wird, bindet an den Her-2/neu-Rezeptor und hemmt dessen Aktivität. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Patientinnen, bei denen ein Her-2/neu-überexprimierender (3+ in der Immunohistochemie, beziehungsweise Amplifikation in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) Tumor nachgewiesen wurde, eine bessere Prognose hatten, sowohl was das Gesamtüberleben, als auch was die Rezidivfreiheit betraf. Darüber hinaus war ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie zu verzeichnen (Slamon et al., 2001; Piccart-Gebhart et al., 2005; Dahabreh et al., 2008). In einer anderen Studie wurde zusätzlich



festgestellt, dass ein zusätzlich zu Trastuzumab verabreichtes Taxan bei voroperierten Patientinnen positive Auswirkungen auf die Prognose hatte (Romond et al., 2005). Trastuzumab wird über ein Jahr hinweg verabreicht.

## Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll zur Beantwortung folgender Fragen beitragen:

- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Amplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$ ?
- Geht eine Koamplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  mit einem günstigeren oder ungünstigeren Krankheitsverlauf einher?
- Besteht eine Korrelation zwischen dem Grad der Amplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  und der Prognose?
- Bietet die Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung gegenüber der Immunohistochemie Vorteile?

## Material und Methoden

Im Folgenden soll ein Überblick über das ausgewählte Patientenkollektiv, über die verwendeten Methoden und das verwendete Material gegeben werden. Bei allen zur Anwendung gekommenen Methoden handelt es sich um Routineverfahren in der pathologischen Diagnostik, die beinahe täglich zur Anwendung kommen. Dennoch wird eine kurze Beschreibung der jeweiligen Verfahren gegeben.

## **Patientenkollektiv**

Bei dem Kollektiv handelte es sich um Patientinnen aus der Frauenklinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, bei denen ein metastasierender Primärtumor der Mamma diagnostiziert worden war und die sich in den Jahren 1991 bis 2004 einer palliativen Chemotherapie unterzogen hatten. Im Pathologischen Institut der LMU lag von diesen Patientinnen Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material aus den Jahren 1986 bis 2004 vor. Bei der endgültigen Auswahl der Fälle wurde darauf geachtet, möglichst komplette Daten bezüglich der Therapie, des Überlebens, des histologischen Typus sowie des Gradings zu haben. Von 245 Frauen standen sowohl entsprechende Daten, als auch Gewebe zur Verfügung. Bei diesen Patientinnen handelte es sich um Frauen im Alter von 25 bis 80 Jahren (Mittelwert 52,92 +/- 11,1 Jahre) bei Diagnosestellung. Das Tumormaterial wurde vor Beginn jeglicher Therapie entnommen und dem Pathologischen Institut übersandt. Bezüglich des histologischen Typs und des Gradings gemäss Elston und Ellis ergab sich folgende Verteilung (Tabelle 2):

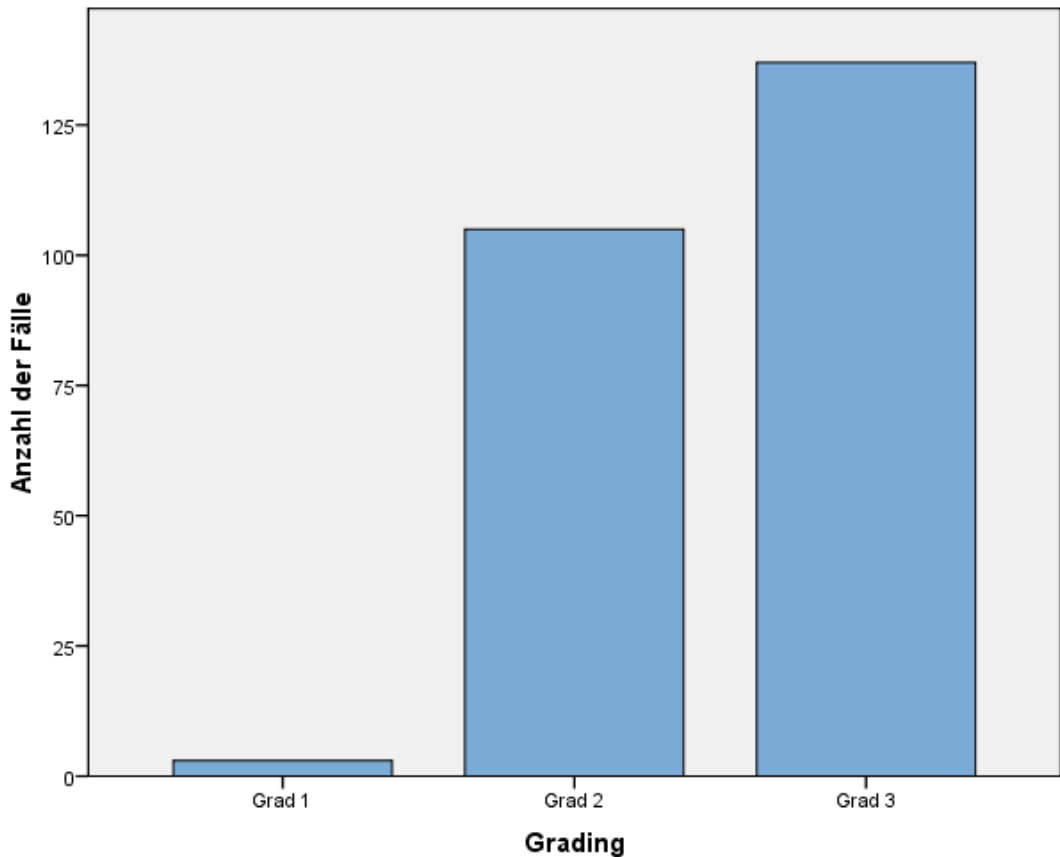
Tabelle 2

			Grading			
			Grad 1	Grad 2	Grad 3	Gesamt
histolog. Typ (Ersttumor)	inv. dukt. Ca	Anzahl	3	87	130	220 89,8%
	inv. lob. Ca	Anzahl	0	17	5	22 9,0%
	inv. dukt. + lob.	Anzahl	0	0	1	1 0,4%
	muzinös	Anzahl	0	0	1	1 0,4%
	adenoid zystisches Ca	Anzahl	0	1	0	1 0,4%
	Gesamt			3 1,2%	105 42,9%	137 55,9%

Bei den in die Studie aufgenommenen 245 Präparaten handelte es sich ausschließlich um metastasierende Karzinome der weiblichen Brust, die vor Gewebeentnahme noch keiner Therapie zugeführt worden waren. Eine bereits vor der Operation begonnene Chemotherapie beziehungsweise das Fehlen von Gewebeproben aus dem Primärtumor waren Ausschlusskriterien.

Das folgende Diagramm (Abbildung 1) zeigt die Verteilung der Tumoren des untersuchten Kollektivs bezüglich des Tumorgradings. Nur in drei Fällen lag

ein hoch differenziertes (Grad 1) Karzinom in dieser Serie von metastasierten Tumoren vor.



**Abbildung 1**

Neben dem Tumorgrading ist auch die Einteilung nach TNM-Klassifikation bedeutsam. Die Verteilung der einzelnen untersuchten Tumoren auf die unterschiedlichen Stadien stellen die folgenden Abbildungen dar. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der in die Studie eingeschlossenen Tumoren auf die unterschiedlichen pT-Stadien, das zweite die Verteilung auf die pN-Stadien und das dritte schließlich die Situation betreffend die Metastasierung.

Einbezogen wurden alle Tumoren des oben beschriebenen Patientenkollektives. Abbildung 3 zeigt die pN-Stadien entsprechend der Definition nach UICC (2007).

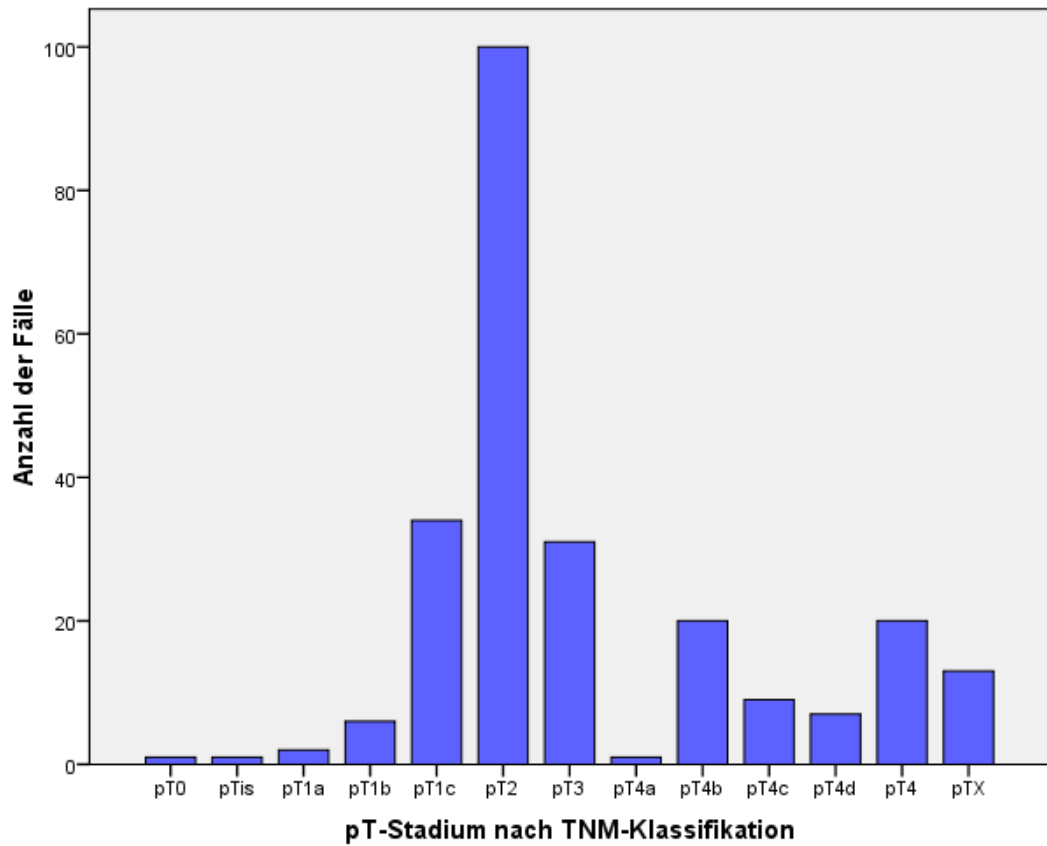
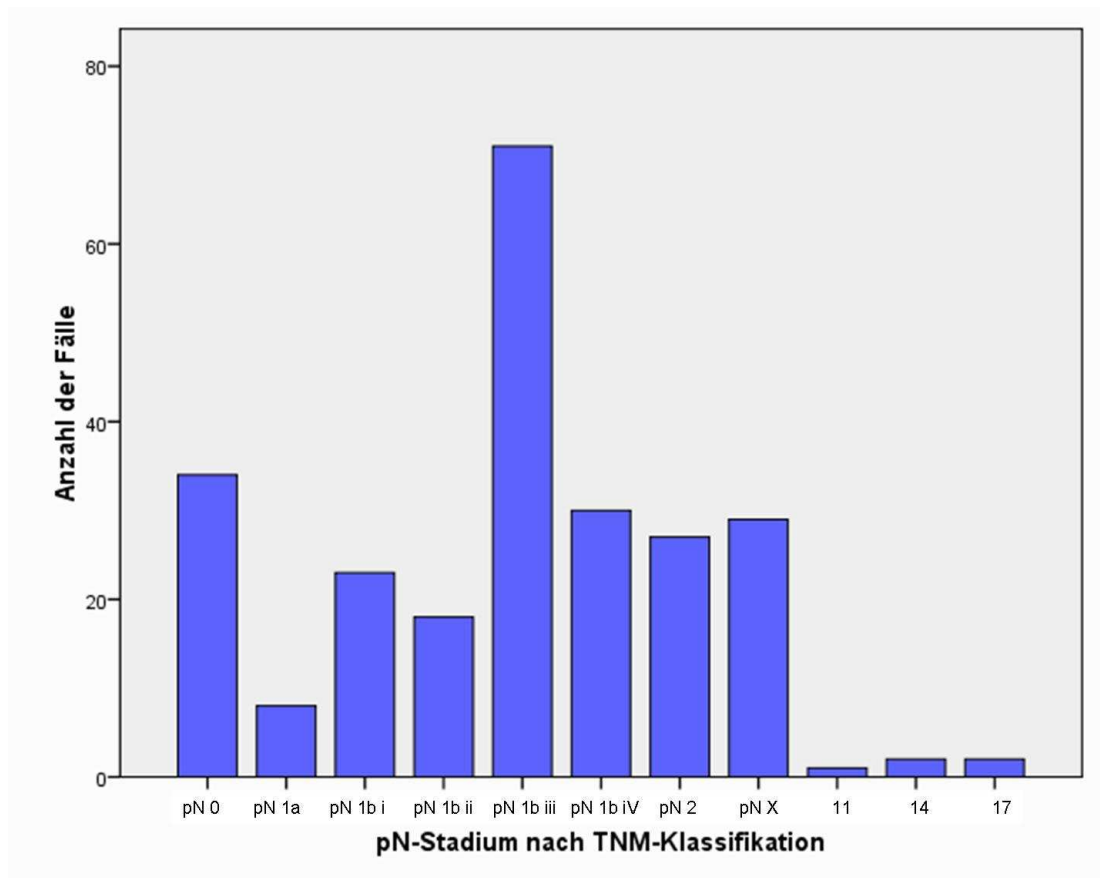
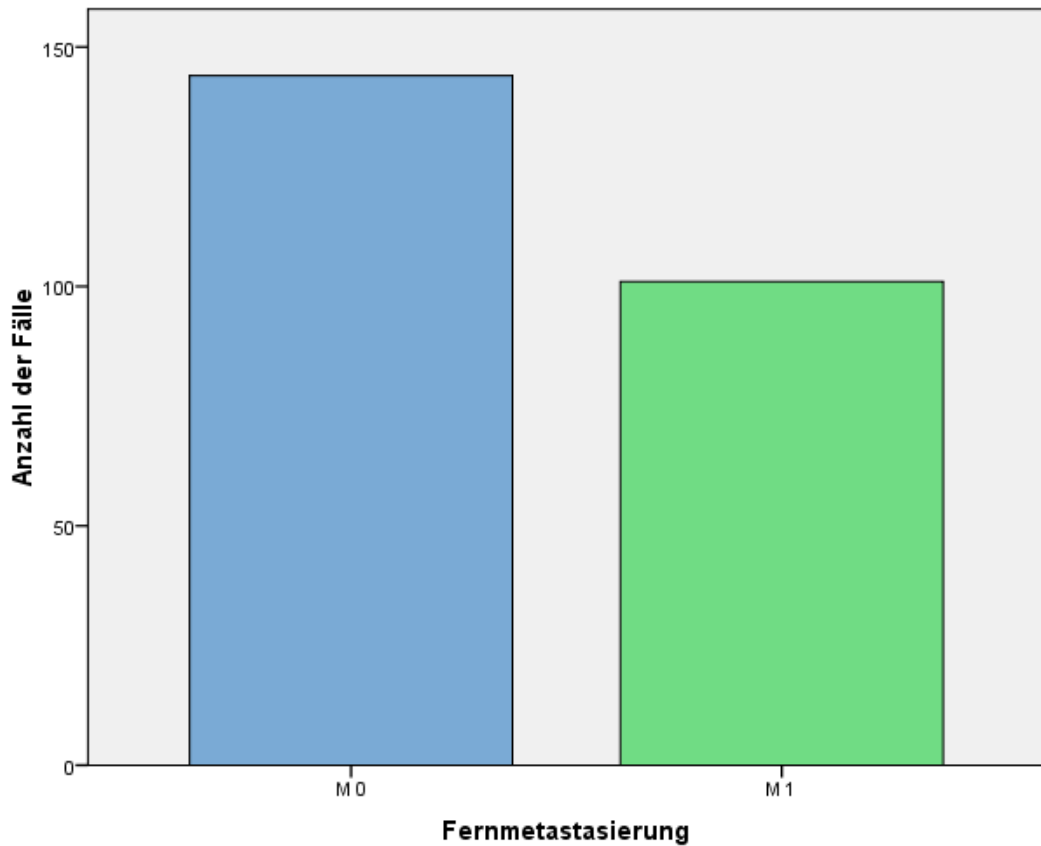


Abbildung 2



**Abbildung 3**

Der dritte Aspekt der TNM-Klassifikation betrifft die Fernmetastasierung. M0 bedeutet keine Fernmetastasierung, M1 jedoch zeigt eine vorhandene Fernmetastasierung an. Nachstehende Abbildung 4 stellt die Verhältnisse für die in der Studie betrachteten Fälle dar.



**Abbildung 4**

Als abschließende Betrachtung der TNM-Klassifikation sei hier noch die Verteilung der Tumoren des Patientenkollektives auf die UICC-Stadien dargestellt (Abbildung 5). Die Verteilung der Stadien bezieht sich hierbei auf die Situation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Wie bereits erwähnt, wurden in die vorliegende Untersuchung lediglich metastasierte Fälle einbezogen.

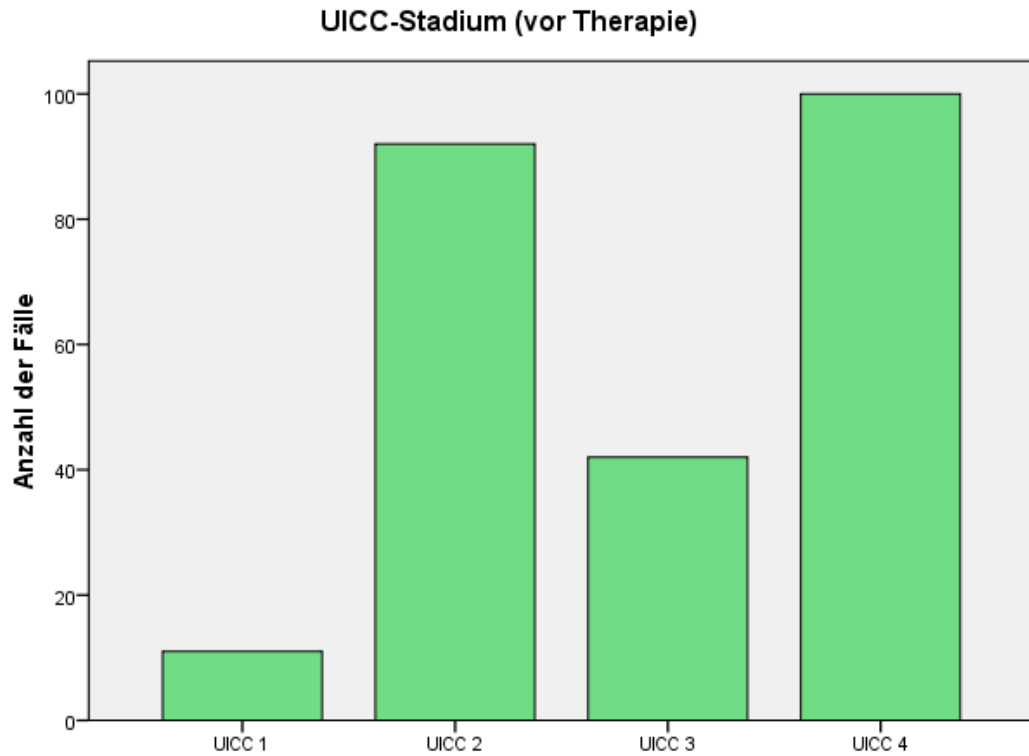


Abbildung 5

## **Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) des Her-2/neu-Gens**

Bei der Durchführung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wurde nach einem etablierten Protokoll vorgegangen. Dieses findet am Pathologischen Institut der LMU München in der Routine-FISH-Diagnostik täglich Anwendung und soll hier kurz dargestellt werden.



Die zu untersuchenden Gewebeproben lagen nach Formalinfixation als Paraffinblöcke vor. Zunächst wurden diese in einer Dicke von 3 bis 4  $\mu\text{m}$  zugeschnitten und auf Super Frost Plus-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht, an der Luft getrocknet und über Nacht bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um das Paraffin zu entfernen, wurden die Schnitte 2x15 Minuten in reinstem Xylol inkubiert. Die Rückstände des Xylols wurden im Anschluss daran 2x10 Minuten in 100%igem Ethanol abgewaschen. Nach Lufttrocknung der Präparate wurden 200 bis 300  $\mu\text{l}$  1-molare angewärmte Natriumisothiocyanat-Lösung auf die Schnitte aufgebracht, diese im Anschluss mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 Minuten bei  $80^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und die Schnitte kurz in Aqua bidest. gespült. Nach Auftragen von 200  $\mu\text{l}$  Pepsinlösung auf das Präparat wurde dieses erneut mit einem Deckglas abgedeckt, wiederum in eine feuchte Kammer gegeben und in dieser bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Brutschrank für weitere 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Deckglas entfernt, das Präparat erneut kurz mit Aqua bidest. gespült und an der Luft getrocknet. Die sich anschließende Denaturierung der Proteine erfolgte mittels einer auf  $80^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten Heizplatte für 20 Minuten. Daraufhin konnte die benötigte Sonde auf den Objektträger aufgebracht werden. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, keine Luftblasen zu erzeugen. Als Sonden fungierten in diesem Fall sowohl PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit (LSI® HER-2/neu Spectrum Orange™ und CEP® 17 Spectrum Green™) (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA), als auch ZytoLight® SPEC HER2/CEN17 Dual Color Probe Kit (ZyGreen für Her-2 und ZyOrange für

CEN17) (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland). Nach Aufbringen einer ausreichenden Menge der Sonde wurde das Präparat erneut mit einem Deckglas versehen und für weitere 10 Minuten auf die auf 80°C vorgewärmte Heizplatte gelegt. Danach wurde das Deckglas mit Fixogum abgedichtet und der Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Deckglas nach Entfernung des Fixogum vorsichtig abgehoben und die Präparate 3x10 Minuten in einem Wasserpuffer gewaschen. Bei diesem handelte es sich um 0,1xSSC, erwärmt auf 42°C. Diese Lösung erhält man, indem man 2,5 ml 20xSSC (3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, pH 5,3; gelöst in 200 ml Aqua bidest.) mit 500 ml Aqua bidest. mischt. Daran schloss sich die 5-minütige Inkubation der Objektträger in 42°C warmen BT-Puffer, bestehend aus 3,1 Natriumhydrogencarbonat, 250µl Tween 20 und 0,05g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, gelöst in 200ml Aqua bidest., an. Nun wurden die Präparate in ihren Ständern kurz auf Zellstoff gestellt, um sie abtropfen zu lassen. Als abschließenden Schritt wurden die einzelnen Präparate mit jeweils 25µl DAPI-Vectashield (1ml Vectashield mit 1µl 4,6-Diamidino-2-Phenylindol) behandelt und erneut mit einem Deckglas versehen. Auch hier wurde wiederum auf luftblasenfreies Arbeiten geachtet.

Nach der damit abgeschlossenen Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, wurden die fertigen Präparate bis zur Auszählung der Signale im Kühlschrank bei etwa 4°C aufbewahrt, um ungewollten Lichteinfall zu vermeiden.

## **Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens**

Die Hybridisierung des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens folgte fast gänzlich dem oben beschriebenen Protokoll. Nach der proteolytischen Andauung durch Pepsin wurde jedoch das *TOP2A* FISH pharm Dx™ Kit (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) als Sondenkit verwendet. Hierbei handelt es sich um ein gebrauchsfertiges FISH-Sondenkit, das eine Markierung der Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplikone mit Texas-Red und eine Fluoreszin-Markierung der PNA-Sonden (Peptide Nucleic Acid), ein chemisch synthetisiertes Nukleinsäure-Analogen, welches in der Lage ist, DNA zu hybridisieren, der Zentromerregion von Chromosom 17 hervorruft. Dies führte auch hier zu einem roten Gensignal und zu einem grünen Zentromersignal. Die Auswertung dieser Präparate richtete sich ebenfalls nach den im nächsten Abschnitt beschriebenen Kriterien.

### **Auswertung der FISH-Präparate**

Es wurden Präparate von 245 Primärtumoren der Mamma ausgewertet. Von diesen 245 Fällen wurden 242 Präparate mit Her-2/neu-Markierung und 241 mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Markierung ausgezählt, sodass insgesamt 483 Schnitte begutachtet wurden. Pro Präparat wurde angestrebt, 100 Zellkerne auszuzählen. Dies gelang in drei Fällen nicht, da nicht ausreichend Zellmaterial vorhanden war oder die Signale zu schwach oder überlappend

waren. In diesen Fällen wurden so viele Kerne wie möglich ausgewertet, mindestens jedoch 50.

Bei der Auswertung wurde zwischen nicht vorhandener Amplifikation und vorhandener Amplifikation, sowie Deletion unterschieden. Darüber hinaus gab es als unklar eingestufte Fälle (Borderline-Fälle). Die Kriterien hierfür richteten sich nach den aktuellsten Empfehlungen der American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (Wolff et al., 2007) und waren wie folgt definiert:

- Ein Fall war als nicht amplifiziert einzustufen, wenn der Quotient Gensignal zu Zentromersignal unter 1,8 lag.
- Von einer vorhandenen Amplifikation war dann auszugehen, wenn der oben erwähnte Quotient über 2,2 lag. Auch Präparate mit Gensignal-Clustern wurden als amplifiziert eingestuft, soweit sie nicht polysom waren.
- Als unklar wurden all jene Präparate gewertet, deren Gensignal-Zentromersignal-Quotient zwischen 1,8 und 2,2 lag. Diese Gruppe enthält die Fälle, die nach Pauletti et al. (2001) als schwach amplifiziert eingestuft werden.
- Von Deletion wurde ausgegangen, wenn mehr als die Hälfte der Zellen Kerne mit zwar einem Gen- aber zwei Zentromersignalen aufwiesen.

Die Ergebnisse wurden auf einem im Institut speziell für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung entwickelten Diagnostikbogen dokumentiert und anschließend archiviert.

Als technisches Hilfsmittel zur Auswertung diente ein Fluoreszenz-Mikroskop vom Typ Axioskop der Firma ZEISS (Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe Typ HBO-100Watt von OSRAM (Deutschland). Zur Auszählung der Zellkerne wurde ein Objektiv des Typs ZEISS Plan-Apochromat mit 63-facher Vergrößerung gewählt. Dieses wurde mit Immersionsöl verwendet. Zur größeren Orientierung im Präparat kamen Objektive mit 10- und 20-facher Vergrößerung zum Einsatz.

Zur optimalen Auswertung der Signale wurden Einfachbandpass-Filter für DAPI (Darstellung der Zellkerne und Zellkerngrenzen), TRITC (Orange)-Einfachfilter (Darstellung der Gensignale bei PathVysion™ Probe Kit (Firma Abbott/Vysis) und bei *TOP2A* FISH pharm Dx™ Kit (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), bzw. Darstellung der Zentromersignale bei ZytoLight® Dual Color Probe Kit (Firma ZytoVision)), sowie FITC (Green)-Einfachfilter (Darstellung der Zentromersignale bei PathVysion™ Probe Kit (Firma Abbot/Vysis) und bei *TOP2A* FISH pharm Dx™ Kit (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), bzw. Darstellung der Gensignale bei ZytoLight® Dual Color Probe Kit (Firma ZytoVision)) verwendet. Darüber hinaus standen Doppelfilter-Kombinationen aus TRITC+FITC und eine Triplefilter-Kombination aus TRITC+FITC+DAPI (Firma LEP/LUDL Electronic Products) zur Verfügung. Zur Steuerung der Filter diente eine Tastatur vom Typ MAC 5000, hergestellt von LEP. Die Auswertung der Präparate richtete sich nach den Herstellerangaben der Sonden-Kits (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove,

IL, USA; ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark).

## **Immunohistochemie**

Zur Anwendung kam der Hercep Test™ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), der auch in der klinischen Routine verwendet wird. Um diesen Test durchzuführen, wurden von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe zunächst Schnitte mit einer Dicke von 2µm hergestellt und im Anschluss auf Super Frost Plus-Objektträger (Fa. Menzel, Deutschland) aufgebracht. An das Entparaffinieren mit Xylol und Äthanol schloss sich die Färbeprozedur an. Zunächst erfolgte die Epitopdemaskierung für 40 Minuten bei 95 bis 99°C, danach das Auskühlen der Objektträger und die Spülung in Puffer. Daran schloss sich das Auftragen des Peroxidase-Blockierungsreagenz an. Nach Inkubation und Abspülen mit Aqua bidest., wurde der Anti-Her2-Antikörper auf die Gewebeproben aufgebracht, nach 30-minütiger Inkubationszeit gefolgt von erneutem Spülen mit Aqua bidest. Daran schloss sich die Behandlung mit dem Visualisierungsreagenz und wiederum eine Inkubationszeit von 30 Minuten, sowie eine erneute Spülung an. Es folgte das Auftragen von Substrat-Chromogen-Lösung (DAB), sowie schließlich das Gegenfärben mit Hämatoxylin und das Eindeckeln der Präparate.

Die Auswertung des Hercep Test™ richtete sich nach den Kriterien der Herstellerfirma (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) unter

Berücksichtigung der bereits erwähnten Arbeit von Wolff et al. (Wolff et al., 2007). Folgende Bewertungsrichtlinien wurden auf die vorliegenden Präparate angewandt:

- Ein Präparat wurde mit „0“ klassifiziert, wenn eine Membranfärbung in 10% der Tumorzellen oder gar keine Färbung zu verzeichnen waren.
- Der Score „1+“ wurde dann vergeben, wenn die Zellmembran der Tumorzellen inkomplett angefärbt war oder wenn weniger als 10% der Tumorzellen eine komplette Markierung der Zellmembran aufwiesen.
- Bei einer Bewertung mit „2+“ war die komplette Zellmembran von mehr als 10% der Tumorzellen schwach bis mäßig gefärbt.
- War in mehr als 30% der Tumorzellen die komplette Zellmembran kräftig gefärbt, konnte eine „3+“ vergeben werden.

Ignoriert wurden starke Färbungen an Gewebegrenzen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Vor Beginn der Auswertungen wurde überprüft, dass die Färbeergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen regelhaft ausgefallen waren.

## **Statistische Auswertung**

Zur statistischen Analyse und zur Dokumentation und Verwaltung der Daten wurde die Software SPSS der Version 16.0 mit einer Lizenz des Leibniz-Rechenzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München

verwendet. Angewendet wurden vor allem Kreuztabellen, Häufigkeitstabellen und Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (1958).

## Ergebnisse

Mithilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurden Primärtumoren der weiblichen Brust von 245 Patientinnen untersucht. Diese wurden bezüglich ihrer Her-2/neu-Genamplifikation und ihrer Topoisomerase-II- $\alpha$ -Genamplifikation begutachtet und bewertet. Von den insgesamt 490 Präparaten konnten drei bezüglich der Her-2/neu-Amplifikation und vier bezüglich der Topoisomerase-Amplifikation nicht ausgewertet werden. Bei diesen Fällen handelt es sich um zwei Patientinnen, bei denen weder die Her-2-neu-Signale, noch die Signale der Topoisomerase-II- $\alpha$  ausgezählt werden konnten, und um Einzelpräparate, bei denen jedoch die Bewertung des jeweils anderen Signals gelang. Bei einem der nicht in die Auswertung eingegangenen Fälle wurde nach Beginn der Untersuchungen festgestellt, dass bei dieser Patientin nicht der Primärtumor für die Analyse vorlag, was einen Ausschluss aus der Studie zur Folge hatte. Bei dem anderen Fall war zu wenig auswertbares Zellmaterial vorhanden und die Hybridisierung mangelhaft. Prozentangaben beziehen sich auf das jeweils ausgewertete Kollektiv (242 vorliegende Präparate für die Her-2/neu-Genamplifikation und 241 Präparate mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Genmarkierung).

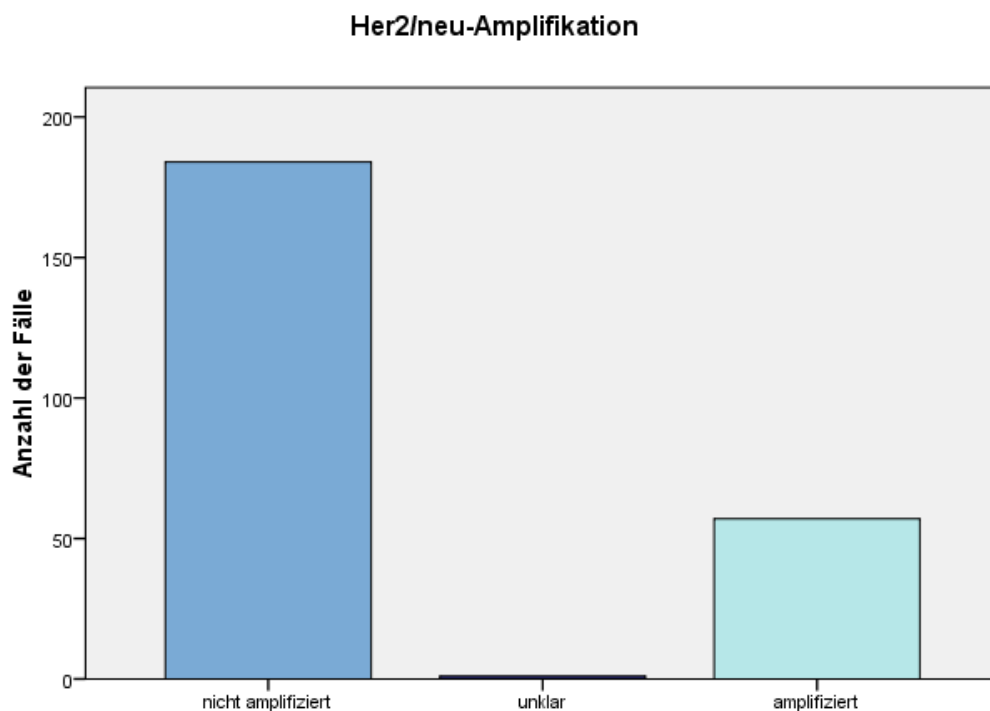


Der Hercep Test™ zur Bestimmung des Her-2/neu-Status konnte bei 160 der 245 Fälle durchgeführt und ausgewertet werden. Prozentangaben beziehen sich auf 160 getestete Fälle.

## **Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Zur Auswertung kamen 483 Präparate, in denen – bis auf drei Fälle – jeweils 100 Zellkerne begutachtet und ausgezählt wurden. In jenen drei Fällen wurden aufgrund des Mangels an Zellmaterial 50 beziehungsweise 60 Zellkerne bewertet und dokumentiert. Drei Präparate wiesen eine Polysomie mit Clustern in den Zentromersignalen auf, diese wurden bei auch vorhandenen Gensignalclustern als nicht amplifiziert gewertet und werden hier auch als solche behandelt. Gleiches gilt für Präparate, in denen eine Deletion zu finden war.

Nach Sichtung aller Präparate ergab sich für die Her-2/neu-Genamplifikation eine hauptsächliche Verteilung auf nicht amplifizierte und amplifizierte Fälle. Lediglich ein Fall war als unklar (Borderline positiv) zu klassifizieren; dieser wies einen Gensignal-Zentromersignal-Quotient von 2,09 auf. Als amplifiziert eingestufte Schnitte imponierten in der Mehrheit durch Cluster von Gensignalen. Cluster von Zentromersignalen lagen bei diesen Fällen nicht vor. Die folgende Abbildung 6 fasst die Ergebnisse für die Her-2/neu-Genamplifikation graphisch zusammen:

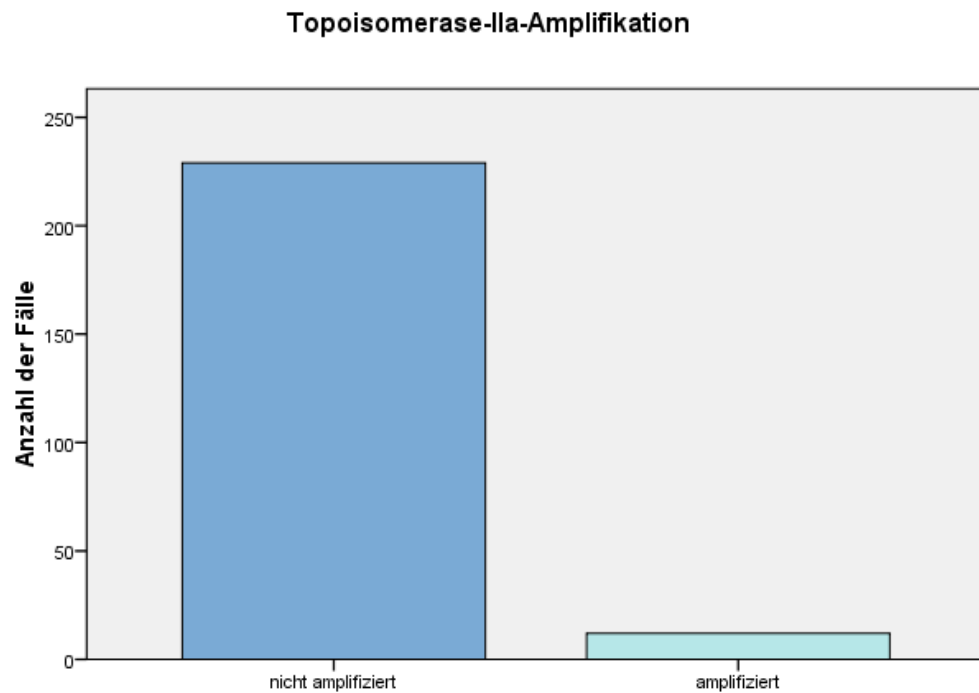


**Abbildung 6**

Wie aus der Abbildung ersichtlich, handelt es sich in der Untersuchungsserie mehrheitlich um nicht amplifizierte Fälle. Dies trifft auf 184 (76,0%) der Präparate zu, während nur 57 (23,6%) der Schnitte als amplifiziert eingestuft werden konnten. Lediglich ein Fall (0,4%) wurde als unklar eingestuft.

Für die Bewertung des Amplifikationsgrades der Topoisomerase-II- $\alpha$  in den Präparaten wurden eben jene Kriterien herangezogen, die auch bei der Beurteilung der Her-2/neu-Genamplifikation Anwendung fanden. Kein einziger Fall musste als „unklar“ klassifiziert werden, sodass in der

Abbildung 7 ausschließlich amplifizierte und nicht amplifizierte Fälle zu finden sind.

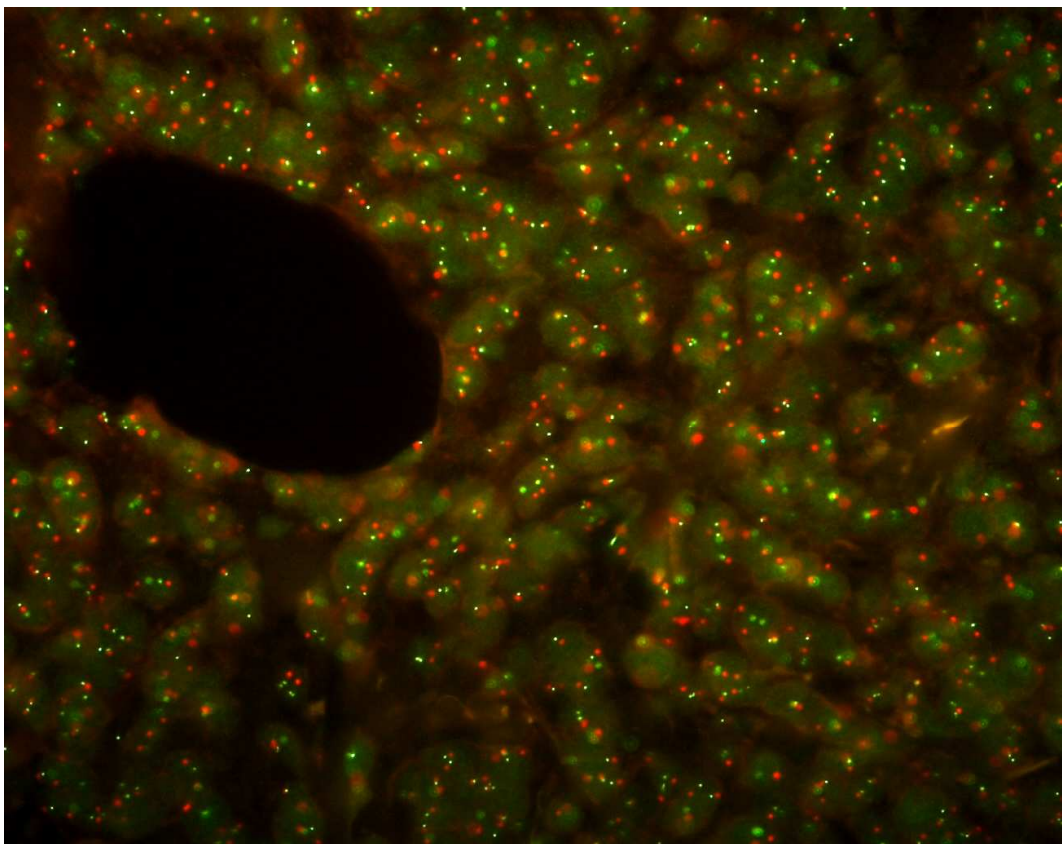


**Abbildung 7**

Auch hier imponiert eine Überzahl der nicht amplifizierten Fälle gegenüber den amplifizierten Fällen. Es handelt sich hierbei um 229 (95,0%) als nicht amplifiziert einzustufende und um 12 (5,0%) als amplifiziert geltende Präparate.

## Darstellung der verschiedenen Amplifikationsgrade laut FISH

Die folgenden Abbildungen 8, 9, 10 und 11 stellen die verschiedenen Amplifikationsgrade der ausgewerteten Präparate anhand von Beispielen dar, wie sie sich in der FISH boten.



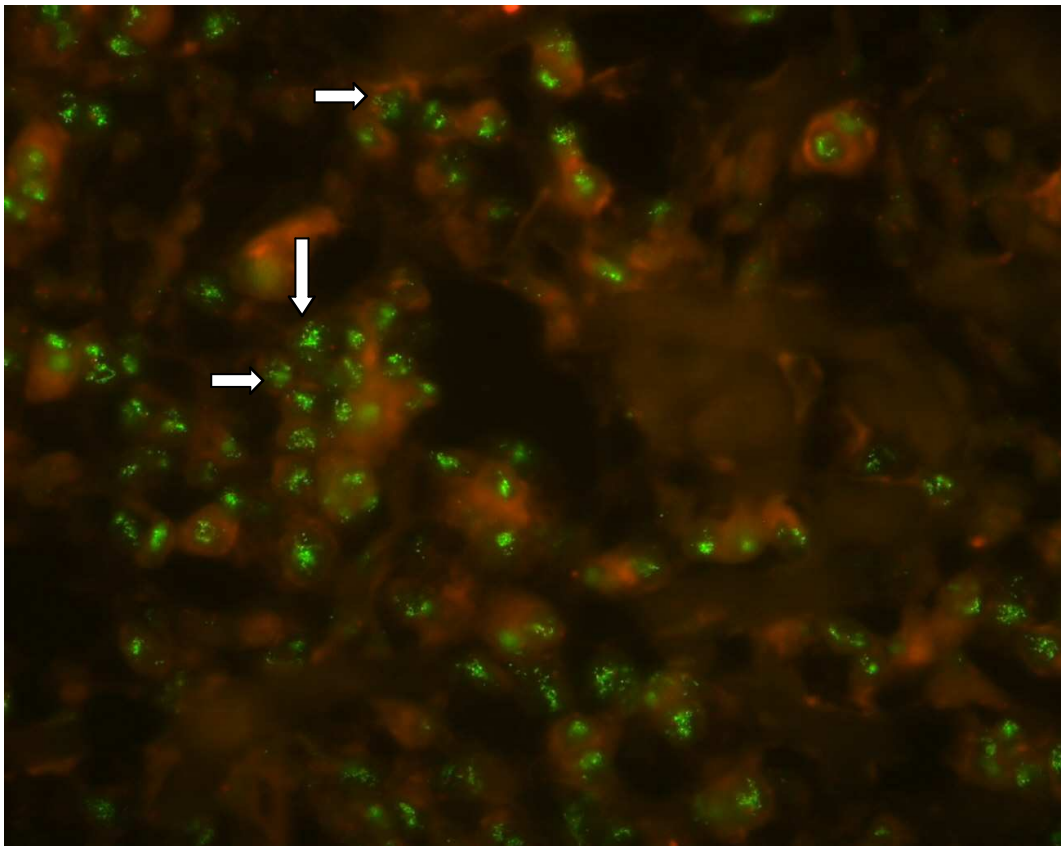
**Abbildung 8**

Abbildung 8 zeigt ein als nicht amplifiziert eingestuftes Präparat. Es handelt sich hierbei um eine Her-2/neu-Markierung mit einem SondenKit der Firma

Zytovision. Die Gensignale sind hier grün und die Zentromersignale rot dargestellt. Deutlich erkennbar sind die Zellgrenzen sowie die meist gleiche Anzahl an Gen- und Zentromersignalen innerhalb dieser Grenzen.

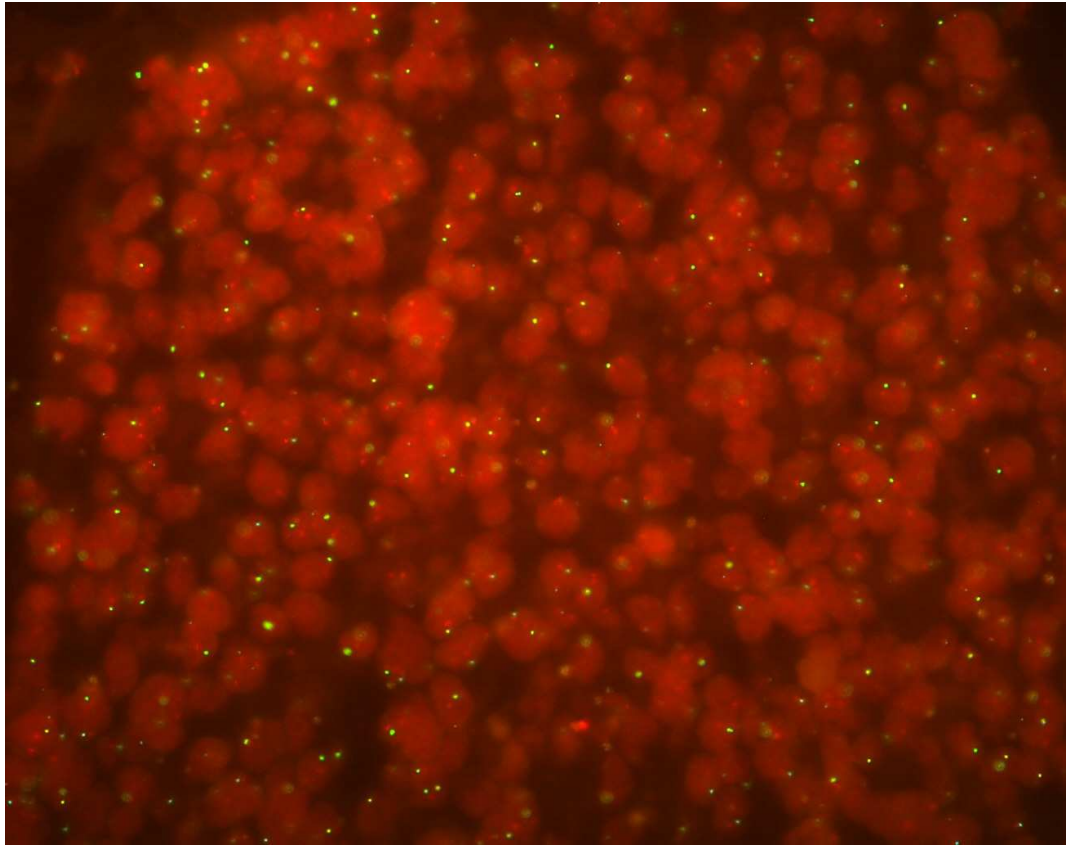
Das folgende Bild (Abbildung 9) zeigt ebenfalls ein Präparat mit Her-2/neu-Markierung mithilfe des Zytovision-SondenKits, sodass auch hier die Gensignale grün dargestellt sind. Auffällig hierbei ist das Vorhandensein von Gensignal-Clustern. Dies zeigt deutlich die Amplifikation des Her-2/neu-Gens an. Die roten Zentromersignale zeigen keine Clusterbildung; es sind nur einzelne Signale sichtbar. Die Pfeile weisen auf Zellen, in denen sowohl Gensignal-Cluster, als auch einzelne Zentromersignale sichtbar sind.

Die Fotodokumentation der Topoisomerase-II- $\alpha$ -FISH Ergebnisse ist nur eingeschränkt möglich, da diese Präparate eine relativ starke rötliche Hintergrundfärbung aufweisen, sodass eine zufriedenstellende Wiedergabe der roten Gensignale äußerst schwierig ist. Das Auszählen der Signale am Fluoreszenzmikroskop war indessen problemlos möglich.



**Abbildung 9**

Die folgende Abbildung 10 zeigt einen Fall ohne Topisomerase-II- $\alpha$  Amplifikation. Vergleichbar dem Her-2/neu-Fall ohne Amplifikation (Abbildung 8) sind auch hier die Zellkerngrenzen erkennbar, innerhalb derer sich vereinzelte Gen- (rot) und Zentromersignale (grün) zeigen. Eine Clusterbildung liegt nicht vor. Die Gensignale sind aufgrund des roten Hintergrunds nur verschwommen, dennoch deutlich erkennbar.

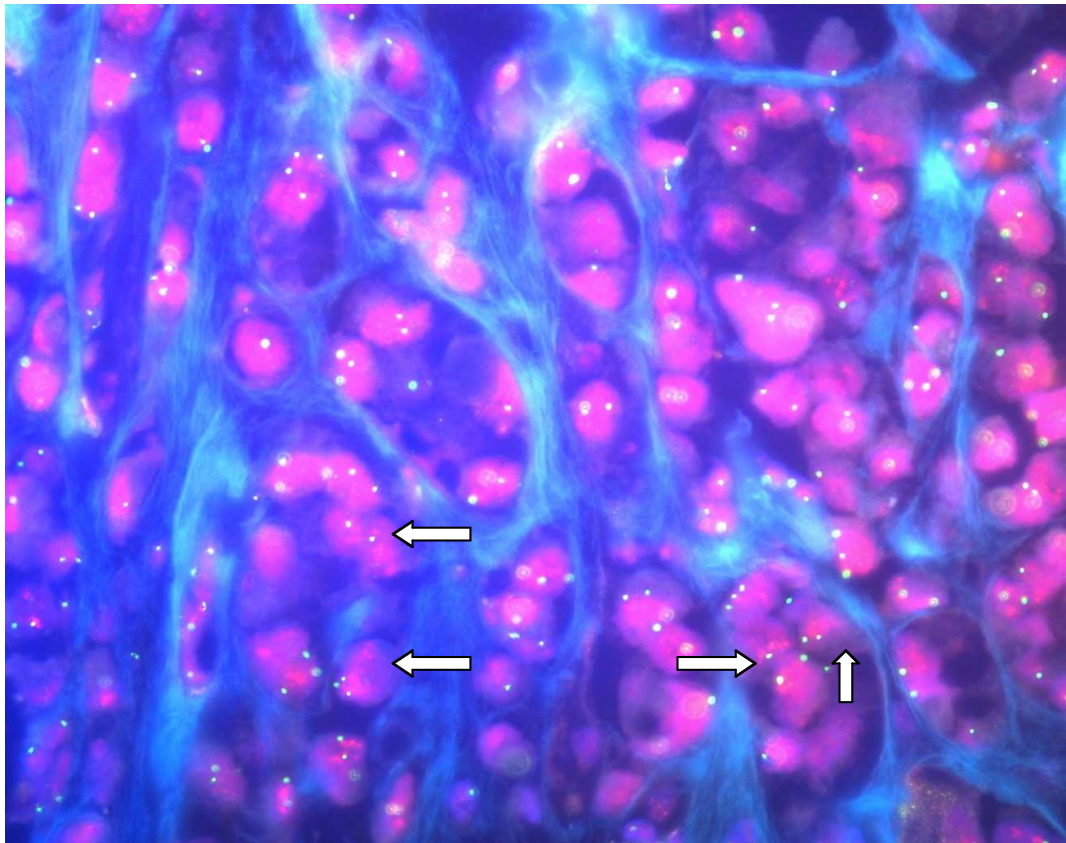


**Abbildung 10**

Der erwähnte rötliche Hintergrund fand sich in allen Topoisomerase-II- $\alpha$ -Präparaten.

Die folgende Abbildung 11 demonstriert beispielhaft einen Fall mit Topoisomerase-II- $\alpha$  Amplifikation. Hier gestaltete sich die Fotodokumentation der vorhandenen roten Gensignal-Cluster als besonders schwierig. Der für die Topoisomerase-II- $\alpha$  typische vermehrt rote Hintergrund nimmt dabei die Brillanz der roten Signale auf der Fotografie,

sodass diese nur schwer erkennbar sind. Die Pfeile deuten auf Zellen, in denen diese Cluster dennoch schwach sichtbar sind.



**Abbildung 11**

Zur besseren Darstellung der roten Signale wurde für dieses Foto ein anderer Filter verwendet. Kumulierte rote Anteile entsprechen Genclustern, vereinzelte grüne Punkte stehen für Zentromersignale.



## Ergebnisse der Immunohistochemie

Der Hercep Test™ wurde von Seiten des Diagnose stellenden Institutes nur an 160 Präparaten durchgeführt, sodass 85 Fälle bezüglich der Immunohistochemie nicht in die Analyse miteinbezogen werden konnten. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte nach den oben genannten Kriterien. Die Graphik (Abbildung 12) gibt einen Überblick über die Resultate.

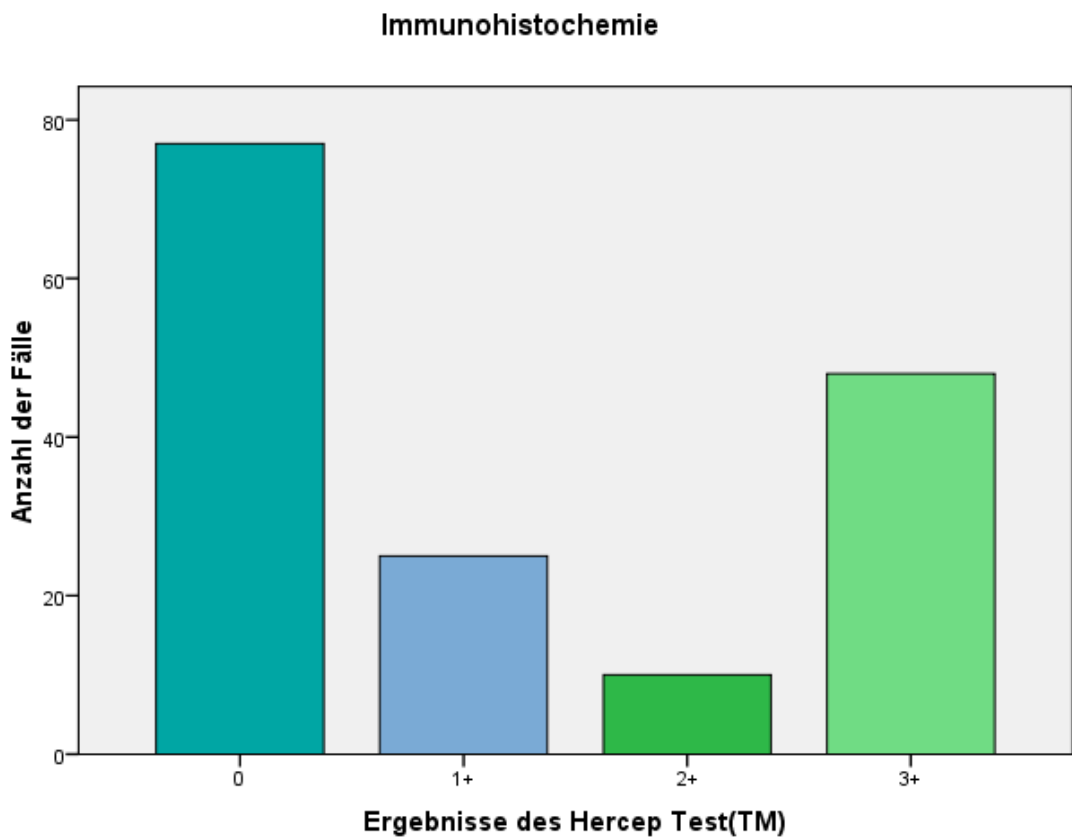


Abbildung 12

Bei Betrachtung dieses Diagramms fällt auf, dass hier die Mehrheit der analysierten Präparate entweder der Gruppe mit dem Score 0 oder der Gruppe mit dem Ergebnis 3+ zuzuordnen ist. Es handelt sich hierbei um insgesamt 125 der 160 Fälle, verteilt auf 77 (48,1%) mit 0, und 48 (30%) mit 3+ bewertete Schnitte. In die Kategorie 1+ wurden 25 (15,6%) der 160 Fälle klassifiziert; lediglich 10 (6,2%) Präparate entfielen auf die Kategorie 2+.

## **Korrelationen**

In diesem Abschnitt sollen die Korrelationen der einzelnen analysierten Parameter dargestellt werden und auf mögliche Beziehungen zu den für das Mammakarzinom relevanten prognostischen Faktoren geprüft werden.

### **Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$**

Bezüglich Her-2/neu fanden sich 184 nicht amplifizierte und 57 amplifizierte Fälle, während bezüglich Topoisomerase-II- $\alpha$  229 nicht amplifizierte und lediglich 12 amplifizierte Präparate zu verzeichnen waren. Dies lässt den Schluss zu, dass die Amplifikation der beiden Merkmale nicht vollständig kongruent ist. Die nachfolgende Tabelle 3 gibt zunächst einen Überblick über das Verhältnis der untersuchten Genamplifikationen untereinander. Diese Tabelle bezieht sich auf 240 Fälle. Die fünf fehlenden Fälle ergeben sich, wie weiter oben erwähnt, aus zwei komplett fehlenden Analysen und zwei

weiteren fehlenden Untersuchungen für Topoisomerase-II- $\alpha$ , sowie eine fehlende Her-2/neu-Gen-Analyse.

**Tabelle 3**

			Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation		
			nicht amplifiziert	amplifiziert	Gesamt
Her-2/neu- Amplifikation	nicht amplifiziert	Anzahl % v. Her- 2/neu-Ampl.	179 98,4%	3 1,6%	182
	unklar	Anzahl % v. Her- 2/neu-Ampl.	1 100,0%	0 0,0%	1
	amplifiziert	Anzahl % v. Her- 2/neu-Ampl.	48 84,2%	9 15,8%	57
	Gesamt	Anzahl	228	12	240

Bezüglich der nicht amplifizierten Fälle untereinander, ergibt sich eine Übereinstimmung von 98,4%. Dies bedeutet, dass 98,4% der Präparate, die keine Amplifikation im Her-2/neu-Gen aufwiesen, auch keine Veränderung im Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gen zeigten. Bei Betrachtung der Ergebnisse in der Gruppe der als amplifiziert klassifizierten Präparate, fällt auf, dass hier eine Übereinstimmung bei lediglich 15,8% der untersuchten Fälle festzustellen war. Damit wiesen sich 84,2% der Fälle mit Her-2/neu-Genamplifikation ein unverändertes Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gen auf, wohingegen lediglich 1,6% der Fälle mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation eine normale Situation des Her2/neu-Gens erkennen liessen. Der in der Her-2/neu-Markierung als

unklar (borderline-positiv) definierte Fall zeigte keine Amplifikation seines Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens.

## Her-2/neu und Immunohistochemie

Die Überprüfung des Her-2/neu-Status mittels Immunohistochemie stellt einen routinemäßig angewandten Test in der klinisch-pathologischen Arbeit dar. Eine Bewertung mit „0“ entspräche in der FISH-Diagnostik einem für Her-2/neu nicht amplifizierten Tumor, während ein Score von 3+ für eine Amplifikation spricht. Bei einem Status von 1+, beziehungsweise 2+ ist eine zusätzliche FISH-Diagnostik zwingend indiziert. In der nachfolgenden Tabelle 4 werden die Ergebnisse der Her-2/neu-FISH den Ergebnissen aus der Immunohistochemie in Form einer Kreuztabelle gegenübergestellt.

**Tabelle 4**

			Her-2/neu-Status (Immunohistochemie)				Gesamt
			0	1+	2+	3+	
Her-2/neu-Amplifikation (FISH)	nicht amplifiziert	Anzahl % v. FISH	71 61,7%	25 21,7%	9 7,8%	10 8,7%	115
	unklar	Anzahl % v. FISH	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1
	amplifiziert	Anzahl % v. FISH	4 9,5%	0 0,0%	1 2,4%	37 88,1%	42
	Gesamt	Anzahl	75	25	10	48	158

Die in der Tabelle angegebenen Prozentzahlen (s. Zeilen „% von FISH“) beziehen sich auf die Anzahl der Fälle, die im Rahmen der Studie sowohl mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, als auch mit Immunohistochemie untersucht werden konnten. Zwei von 160 Fällen waren in der FISH mit Her-2/neu-Markierung nicht ausgewertet worden.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ergibt sich hier eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Immunohistochemie und der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (61,7 bzw. 88,1%). Ergänzend zu oben dargestellter Tabelle dient folgendes Diagramm (Abbildung 13) der graphischen Darstellung der Ergebnisse:

Das Diagramm zeigt, wie auch Tabelle 4, das große Maß an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Immunohistochemie (Hercep Test™) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ( $p = 0.0001$ ). Bemerkenswert ist jedoch, dass 4 immunhistologisch negative Fälle in der FISH-Analyse eine Her2/neu Amplifikation aufwiesen.

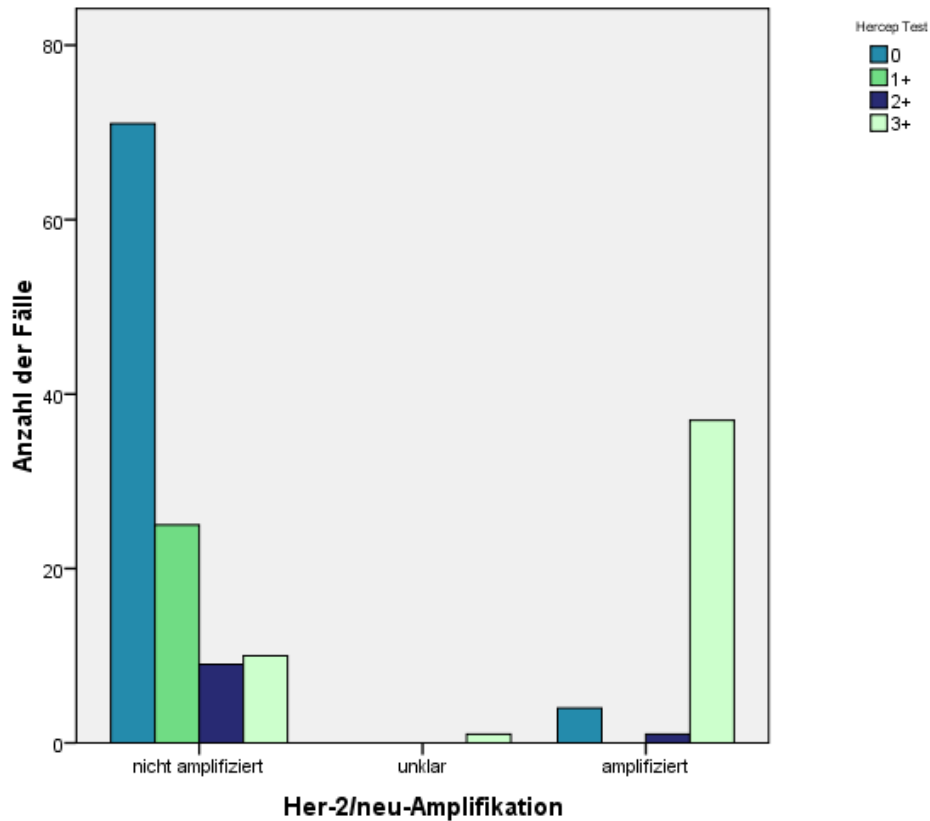


Abbildung 13

## Amplifikation und prognostisch relevante Faktoren

Neben der Immunohistochemie und der FISH spielen auch noch eine Reihe anderer Faktoren eine wichtige Rolle bei der Einschätzung der Prognose des metastasierten Mammakarzinoms.

### Histologischer Subtyp

Eine wichtige Rolle kommt der histologischen Klassifikation des Tumors zu. Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv konnten fünf histologische

Subtypen nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um das invasiv duktale, das invasiv lobuläre, das gemischt invasiv lobuläre und duktale, das muzinöse und das adenoid-zystische Karzinom. Vorrangig liegen hier invasiv duktale und invasiv lobuläre Karzinome vor. Folgende Tabelle 5 zeigt den Her-2/neu Amplifikationsstatus für die jeweiligen histologischen Typen.

**Tabelle 5**

			histologischer Typ					Gesamt
			invasiv duktal	invasiv lobulär	invasiv duk.+ lob.	muzinös	adenoid-zystisch	
Her-2/neu-Ampl. (FISH)	nicht amplifiziert	Anzahl 1 % v. FISH	159 86,4%	22 12,0%	1 0,5%	1 0,5%	1 0,5%	186
	unklar	Anzahl 1 % v. FISH	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1
	amplifiziert	Anzahl 1 % v. FISH	57 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	57
	Gesamt	Anzahl 1	217	22	1	1	1	242

Es zeigt sich, dass die Mehrheit der untersuchten Fälle dem Subtypus eines invasiv duktales Karzinoms entspricht. Eine Her-2/neu Amplifikation in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde ausschliesslich bei diesem Tumortyp festgestellt. Lediglich 25 Fälle gehören einem anderen Subtypus an, davon sind 22 den invasiv lobulären Karzinomen zuzuordnen. Her2/neu Veränderungen konnten bei diesen Tumoren nicht nachgewiesen werden.

Eine ähnliche Tabelle (Tabelle 6) lässt sich auch für die Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation erstellen:

**Tabelle 6**

			histologischer Typ					Gesamt
			invasiv duktal	invasiv lobulär	invasiv duk.+ lob.	muzinös	adenoid-zystisch	
Topoisomerase-II- $\alpha$ -Ampl. (FISH)	nicht amplifiziert	Anzahl % v. FISH	204 89,1%	22 9,6%	1 0,4%	1 0,4%	1 0,4%	229
	amplifiziert	Anzahl % v. FISH	12 100,0 %	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	12
	Gesamt	Anzahl	216	22	1	1	1	241

Auch hier zeigt sich ein augenfälliger Zusammenhang zwischen in der FISH festgestellter Amplifikation und histologischem Typus. Alle für die

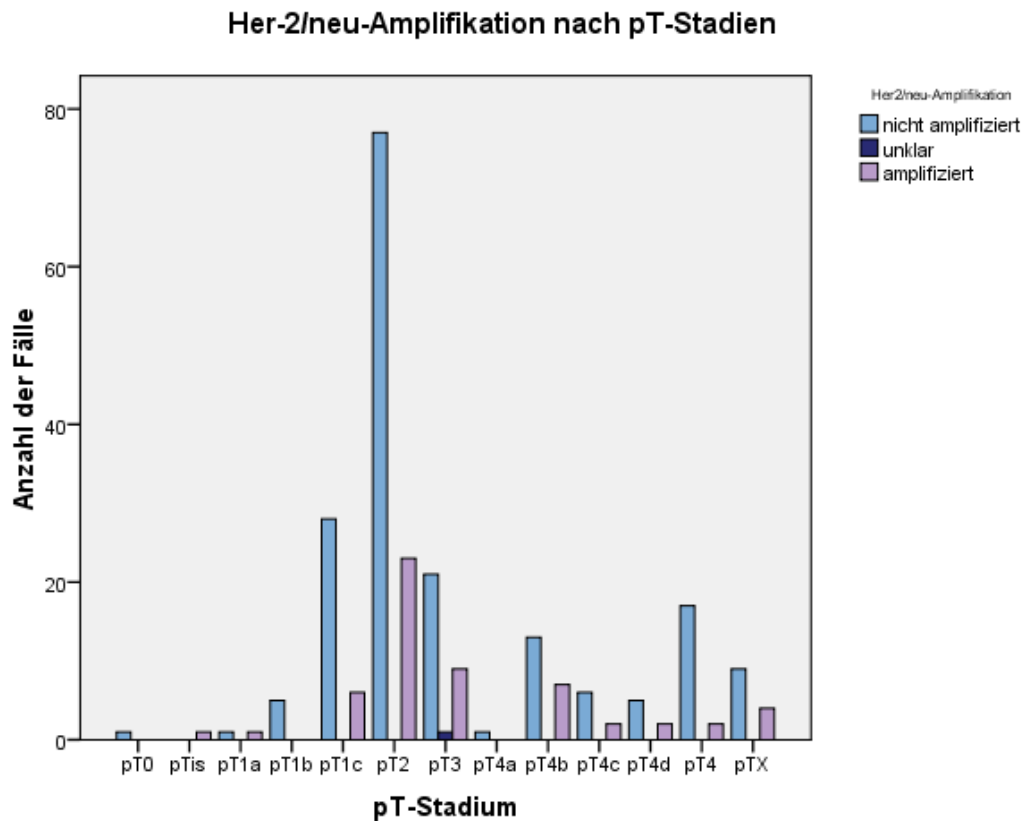


Topoisomerase-II- $\alpha$  als amplifiziert eingestuft Fälle entsprechen einem invasiv duktalem Karzinom. Dies gilt jedoch auch für 204 der 229 nicht amplifizierten Fälle. Aus diesem Grund erreicht dieser Zusammenhang nicht statistische Signifikanz (Chi-Quadrat-Test nach Pearson:  $p = 0,833$ )

## **TNM-Klassifikation**

### **pT-Stadium**

Die überwiegende Mehrheit der mit FISH untersuchten Tumoren (100 Fälle, 40,8%) wurde bei der Erstdiagnose als pT2 klassifiziert und bildet so die größte Gruppe. Die restlichen Fälle verteilen sich auf die übrigen Stadien, wobei pT1c, pT3, pT4b und pT4 die größeren Gruppen bilden. In ihnen befinden sich insgesamt 43,0% aller 245 eingeschlossenen Fälle. Bei Analyse der pT-Stadien im Vergleich zum Her-2/neu-Status in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ergibt sich, dass eine Mehrzahl der als nicht amplifiziert eingestuften Fälle in der Gruppe pT2 zu finden ist (siehe Abbildung 14,  $p = 0.798$ ).



**Abbildung 14**

Die Korrelation von Topoisomerase-II- $\alpha$  zu den jeweiligen pT-Stadien erbrachte ähnliche Ergebnisse. Auch hier wurde eine überwiegende Mehrheit dem Stadium pT2 zugeordnet, siehe folgendes Diagramm (Abbildung 15).

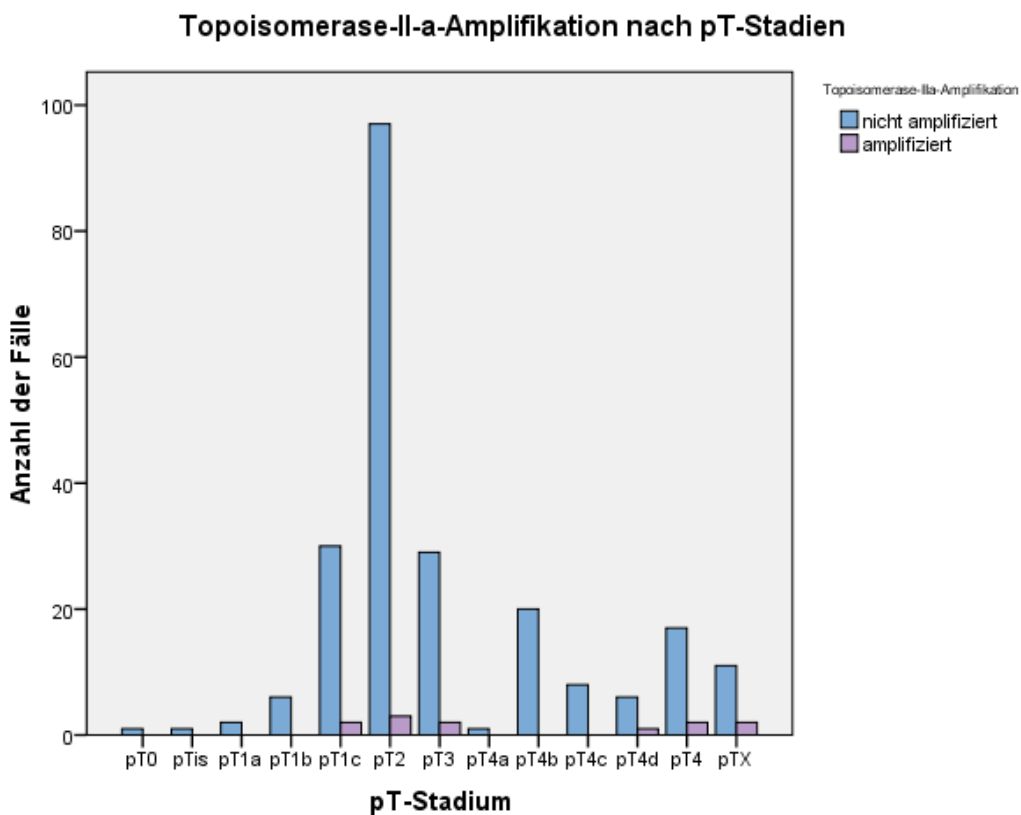


Abbildung 15

### pN-Stadium

Wie aus der Abbildung 16 im Teil Material und Methoden ersichtlich findet sich für eine Mehrheit der Fälle das Stadium pN1biii (71 Fälle, 29,0%).

Etwaige weitere Relationen zwischen dem pN-Stadium nach TNM-Klassifikation und der Amplifikation von Her-2/neu, beziehungsweise Topoisomerase-II- $\alpha$  in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zeigen die

folgenden Tabellen 7 und 8 auf. Tabelle 7 bezieht sich auf die Amplifikation von Her-2/neu, während Tabelle 8 die Amplifikation von Topoisomerase-II- $\alpha$  darstellt.

**Tabelle 7**

			Her-2/neu-Amplifikation (FISH)			Gesamt
			nicht amplifiziert	unklar	amplifiziert	
pN-Status nach TNM- Klassifikation	pN0	Anzahl % v. pN	27 79,4%	0 0,0%	7 20,6%	34
	pN1a	Anzahl % v. pN	7 87,5%	0 0,0%	1 12,5%	8
	pN1bi	Anzahl % v. pN	18 78,3%	0 0,0%	5 21,7%	23
	pN1bii	Anzahl % v. pN	15 83,3%	0 0,0%	3 16,7%	18
	pN1biii	Anzahl % v. pN	51 73,9%	0 0,0%	18 26,1%	69
	pN1biv	Anzahl % v. pN	23 76,7%	0 0,0%	7 23,3%	30
	pN2	Anzahl % v. pN	22 81,5%	1 3,7%	4 14,8%	27
	pNX	Anzahl % v. pN	18 64,3%	0 0,0%	10 35,7%	28

			Her-2/neu-Amplifikation (FISH)			Gesamt
			nicht amplifiziert	unklar	amplifiziert	
	11	Anzahl % v. pN	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1
	14	Anzahl % v. pN	1 50,0%	0 0,0%	1 50,0%	2
	17	Anzahl % v. pN	2 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2
	Gesamt	Anzahl	184	1	57	242

Obige Tabelle bezieht sich auf 242 ausgewertete FISH-Präparate mit Her-2/neu-Markierung. 51 der 184 als nicht amplifiziert eingestuften Fälle wurden als Stadium pN1biii klassifiziert, das entspricht 73,9% der pN1biii-Gruppe. Zum Vergleich der Prozentzahlen der jeweiligen Gruppen sei im Anschluss folgende Tabelle 9 gegeben. Sie bezieht sich auf eine Gesamtzahl von 241 Fällen.

Tabelle 8

			Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation (FISH)		Gesamt
			nicht amplifiziert	amplifiziert	
pN-Status nach TNM- Klassifikation	pN0	Anzahl % v. pN	31 93,9%	3 6,1%	34
	pN1a	Anzahl % v. pN	8 100,0%	0 0,0%	8
	pN1bi	Anzahl % v. pN	21 91,3%	2 8,7%	23
	pN1bii	Anzahl % v. pN	17 100,0%	0 0,0%	17
	pN1biii	Anzahl % v. pN	68 97,1%	2 2,9%	70
	pN1biv	Anzahl % v. pN	29 96,7%	1 3,3%	30
	pN2	Anzahl % v. pN	25 92,6%	2 7,4%	27
	pNX	Anzahl % v. pN	25 89,3%	3 10,7%	28
	11	Anzahl % v. pN	1 100,0%	0 0,0%	1
	14	Anzahl % v. pN	2 100,0%	0 0,0%	2
	17	Anzahl % v. pN	2 100,0%	0 0,0%	2
	Gesamt	Anzahl	229	12	241

## M-Stadium

Es handelt sich bei den vorliegenden Präparaten um 144 (58,8%) Fälle, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Stadium M0, damit als nicht fernmetastasiert eingestuft, und 101 (41,2%) als fernmetastasiert geltende Fälle.

Folgende Abbildungen 16 und 17 zeigen ebenjene Einteilung nach Fernmetastasierung in Abhängigkeit von Her-2/neu (Abbildung 16), beziehungsweise in Abhängigkeit von Topoisomerase-II- $\alpha$  (Abbildung 17).

Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung der beiden M-Stadien bei den amplifizierten und nicht amplifizierten Fällen. 57,1% der Tumoren ohne Her-2/neu-Amplifikation befanden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Stadium M0, während dies für 64,9% der Fälle mit Her-2/neu-Amplifikation zutrifft. Der bei der FISH-Diagnostik als unklar (borderline-positiv) deklarierte Fall, wurde dem M0-Stadium zugerechnet.

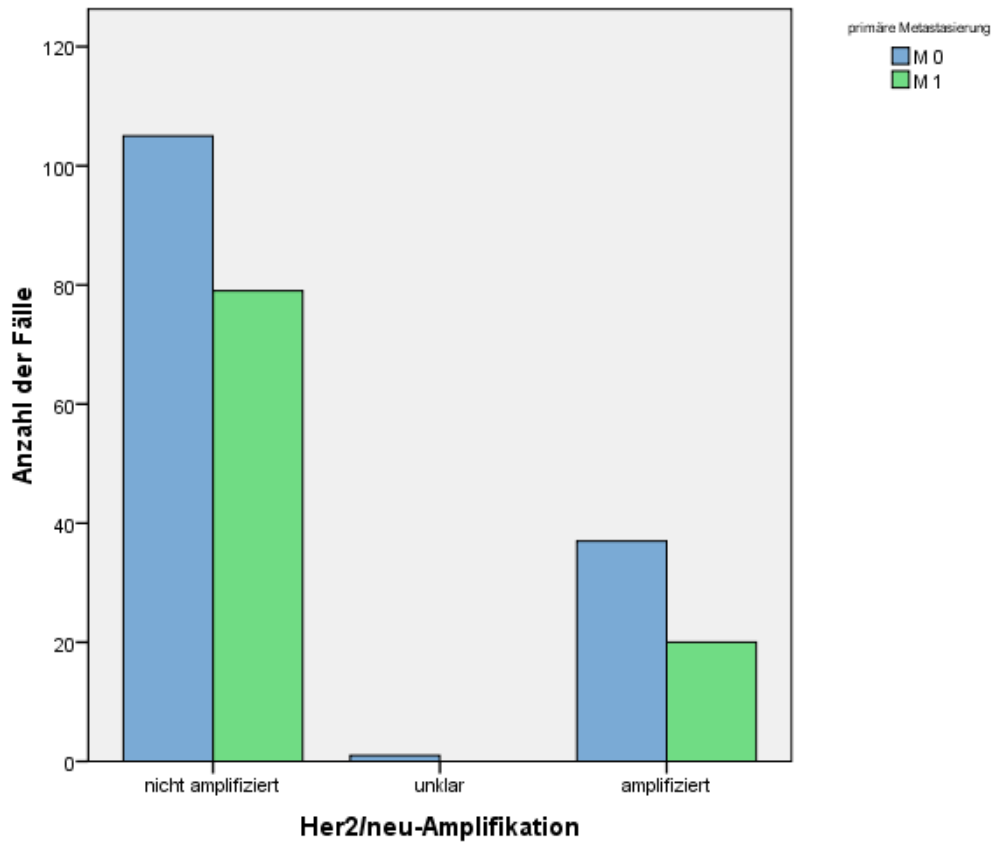


Abbildung 16



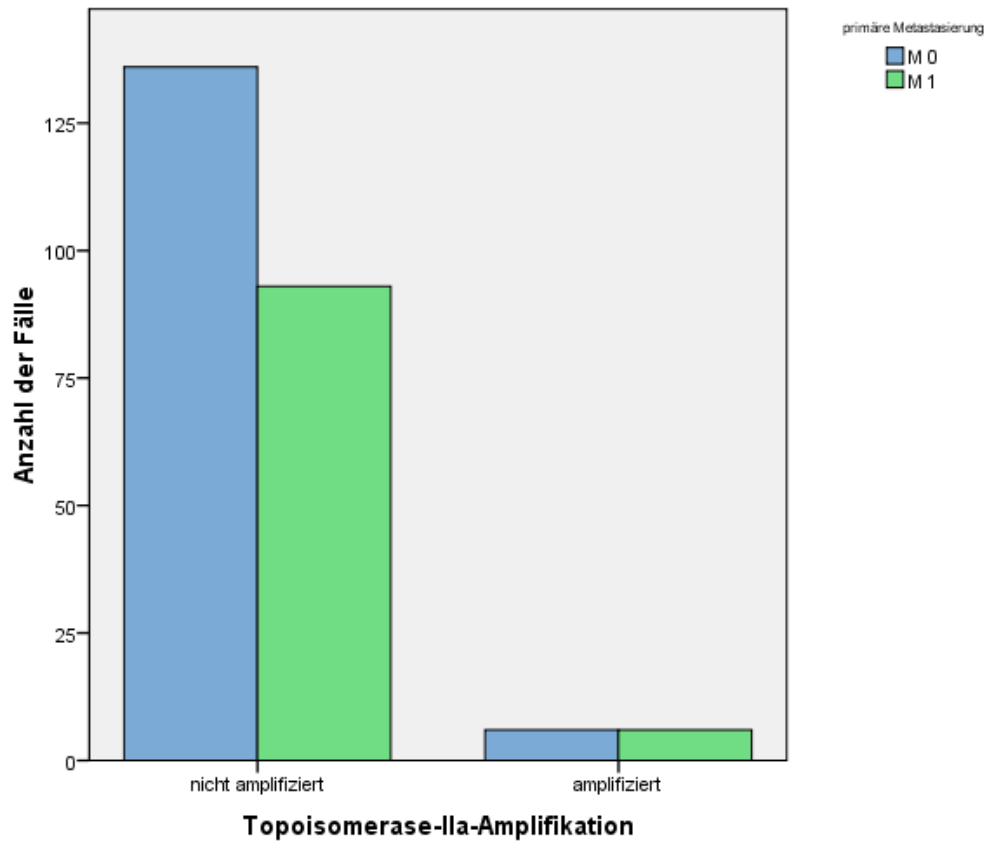


Abbildung 17

Wiederum befindet sich die Mehrzahl (59,3%) der für die Topoisomerase-II- $\alpha$  mittels FISH als nicht amplifiziert klassifizierten Tumoren in Stadium M0, während für die amplifizierten Fälle ein ausgewogenes Verhältnis von 50% zu 50% besteht.

## Grading

Die Mehrheit der Mammakarzinome dieser Studie wurde den Gruppen G2 und G3, also den mäßig, beziehungsweise schlecht differenzierten Tumoren zugeordnet. Allein drei der 245 Fälle konnten der Gruppe G1 zugeordnet werden. Dies entspricht 1,2%. 105 (42,9%) Tumoren wurden als G2 gradet, während 137 (55,9%) Präparate auf die Gruppe G3 entfallen.

Die nachfolgenden Tabellen 9 und 10 beleuchten den Zusammenhang zwischen dem Amplifikationsstatus und Grading des jeweiligen Tumors. In der Tabelle 10 wird die Verteilung der Grading-Gruppen in Bezug auf den Status des Her-2/neu-Gens, in Tabelle 11 bezüglich des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikationsstatus dargestellt.

**Tabelle 9**

			Grading			Gesamt
			G1	G2	G3	
Her-2/neu-Amplifikation (FISH)	nicht amplifiziert	Anzahl % v. FISH	3 1,6%	89 48,4%	92 50,0%	184
	unklar	Anzahl % v. FISH	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1
	amplifiziert	Anzahl % v. FISH	0 0,0%	15 <b>26,3%</b>	42 <b>73,7%</b>	57
	Gesamt	Anzahl	3	104	135	242

Tabelle 10

			Grading			Gesamt
			G1	G2	G3	
Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation (FISH)	nicht amplifiziert	Anzahl % v. FISH	2 0,9%	100 43,7%	127 55,5%	229
	amplifiziert	Anzahl % v. FISH	0 0,0%	4 33,3%	8 66,7%	12
	Gesamt	Anzahl	2	104	135	241

Die relevanten Prozentangaben sind in beiden Tabellen zur übersichtlicheren Darstellung hervorgehoben.

## Darstellung der unterschiedlich amplifizierten Fälle

Abschließend folgt eine tabellarische Darstellung (Tabelle 11) der Ergebnisse der bezüglich Her2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  unterschiedlich amplifizierten Fälle unter Berücksichtigung von histologischem Typ, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und Grading. Diese Tabelle dient vor allem zur erleichternden Orientierung der oben ausgeführten Kriterien und soll einen Überblick über die unterschiedlich amplifizierten Fälle geben. Diesen Fällen galt während der Untersuchung ein besonderes Augenmerk und sie sollen deshalb an dieser Stelle in ihrer Gesamtheit und den jeweils ermittelten Eigenschaften dargestellt werden.

Tabelle 11

FISH Nr.	FISH Her-2	FISH Top II $\alpha$	Imm. hist. chemie	histol. Typ	pT	pN	M	UICC-Stadium	Grading
12	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT2	pN0	M0	2	G2
15	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	pN1biii	M0	3	G3
26	unklar	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	pN2	M0	3	G3
31	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT3	pN1biv	M0	3	G2
40	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT4b	pN1biv	M1	4	G3
71	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT2	pN1biii	M1	4	G3
78	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN0	M0	2	G3
91	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN0	M0	2	G2
105	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1bii	M0	2	G3
109	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pTX	pNX	M1	4	G2
119	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1bi	M0	2	G3
124	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pTis	pN0	M0	2	G3
128	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biv	M0	2	G3
133	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT4	pNX	M1	4	G3
140	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT1a	pNX	M1	4	G3
147	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT1c	pN1biii	M0	2	G2
154	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN0	M1	4	G2

FISH Nr.	FISH Her-2	FISH Top II $\alpha$	Imm. hist. chemie	histol. Typ	pT	pN	M	UICC-Stadium	Grading
170	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pTX	pNX	M1	4	G3
172	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT1c	pNX	M0	1	G2
179	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT3	pN1biii	M0	3	G3
186	nicht amplifiziert	amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT2	pN2	M0	3	G2
207	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	pN1biii	M0	3	G2
253	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT4b	pN1biv	M1	4	G3
257	amplifiziert	nicht amplifiziert	0	inv. duktal	pT2	pN1bi	M0	2	G3
282	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	11	M0	3	G3
291	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT4d	pN1biii	M0	3	G3
297	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT1c	pN0	M0	1	G2
304	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT2	pN1bii	M0	2	G2
313	amplifiziert	nicht amplifiziert	0	inv. duktal	pT4c	pN1bIII	M1	4	G3
321	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT1c	pN0	M0	1	G2
322	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT4b	pN2	M0	3	G3
335	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT4b	14	M1	4	G3
339	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	pN1biii	M0	3	G3
340	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT2	pN1biii	M0	2	G3

FISH Nr.	FISH Her-2	FISH Top II $\alpha$	Imm. hist. chemie	histol. Typ	pT	pN	M	UICC-Stadium	Grading
341	amplifiziert	nicht amplifiziert	fehlt	inv. duktal	pT4c	pN2	M1	4	G3
347	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biv	M0	2	G3
349	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT3	pN1a	M0	3	G3
352	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1bii	M0	2	G3
353	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT1c	pN1biii	M0	2	G2
362	amplifiziert	nicht amplifiziert	2+	inv. duktal	pT4b	pNX	M1	4	G3
363	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN2	M0	3	G3
370	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT1c	pN1bi	M0	2	G3
376	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biii	M0	2	G3
381	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT4b	pN2	M1	4	G3
386	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biii	M0	2	G3
396	amplifiziert	nicht amplifiziert	0	inv. duktal	pT4b	pNX	M1	4	G3
425	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1bii	M0	2	G2
438	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biii	M1	4	G3
447	nicht amplifiziert	amplifiziert	1+	inv. duktal	pT4	pN2	M1	4	G3
455	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biii	M0	2	G2
464	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biii	M0	2	G3

---

FISH Nr.	FISH Her-2	FISH Top II $\alpha$	Imm. hist. chemie	histol. Typ	pT	pN	M	UICC-Stadium	Grading
467	amplifiziert	nicht amplifiziert	3+	inv. duktal	pT2	pN1biv	M0	2	G3

## Überlebensanalysen

Zur Beantwortung der Frage nach prognostisch relevanten Faktoren für das Mammakarzinom wurden Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier durchgeführt.

### Allgemeine Überlebenskurve

Von den 245 in der Studie analysierten Patientinnen waren zu Ende der Datenerhebung 221 (90,2%) verstorben, davon 211 (95,5%) tumorabhängig. Lediglich 15 Patientinnen (6,1%) waren noch am Leben, von neun Patientinnen (3,7%) lagen keine Verlaufsdaten vor („lost to follow up“). Die mittlere Überlebenszeit ab erster Metastase beträgt 30,6 Monate (Standardabweichung 27,3), mit einem Minimum von 0,16 Monaten und einem Maximum von 151,1 Monaten. Abbildung 18 zeigt die Gesamtüberlebenskurve (overall survival, kumulatives Überleben) ab dem Zeitpunkt der Diagnose der ersten Metastase in Monaten.



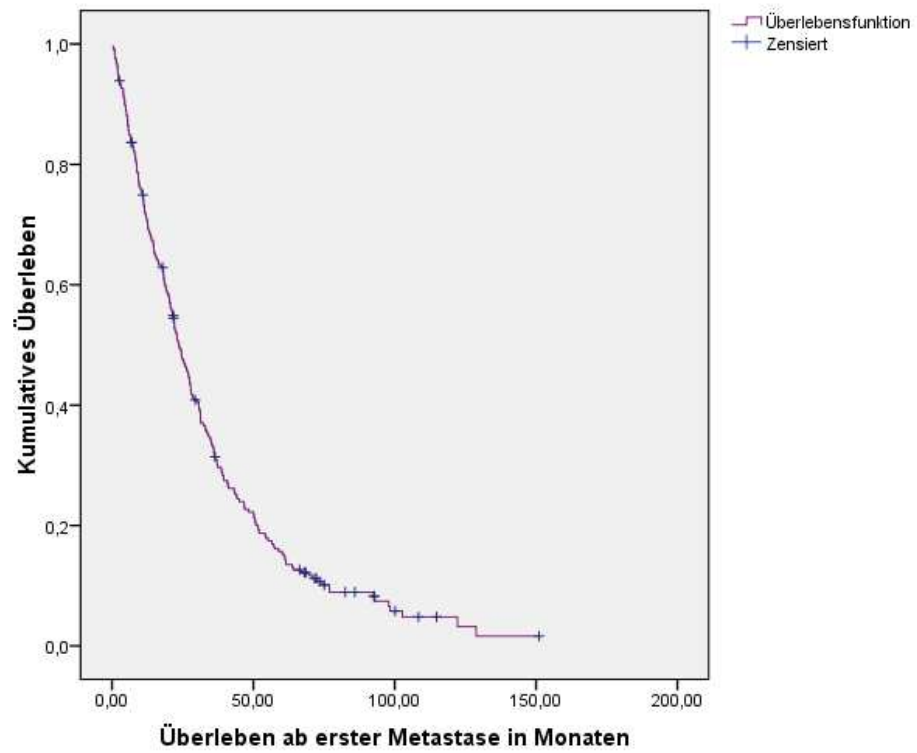


Abbildung 18

## Überleben in Abhängigkeit vom Amplifikationsstatus

Abbildung 19 zeigt die Überlebenskurve für das Kollektiv in Beziehung zum Her-2/neu-Status.

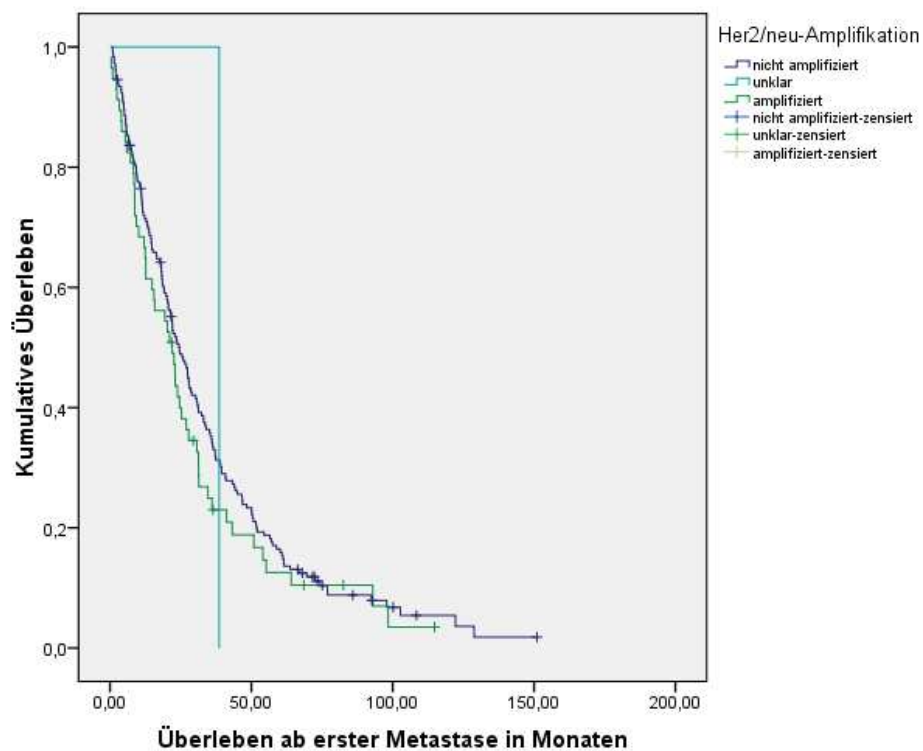


Abbildung 19

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit vorhandener Amplifikation ( $n = 57$ ) und nicht vorhandener Amplifikation ( $n = 184$ ) (Log-rank-Test:  $p = 0,585$ ). Die mittlere Überlebenszeit liegt für erstere bei 34,6 Monaten mit einer Standardabweichung von 2,6, für die zweite bei

29,4 Monaten mit einer Standardabweichung von 4,0. Die einzige Patientin mit unklarem (borderline-positiv) FISH-Ergebnis überlebte 38,7 Monaten.

Abbildung 20 zeigt die Überlebenskurve in Abhängigkeit vom Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status.

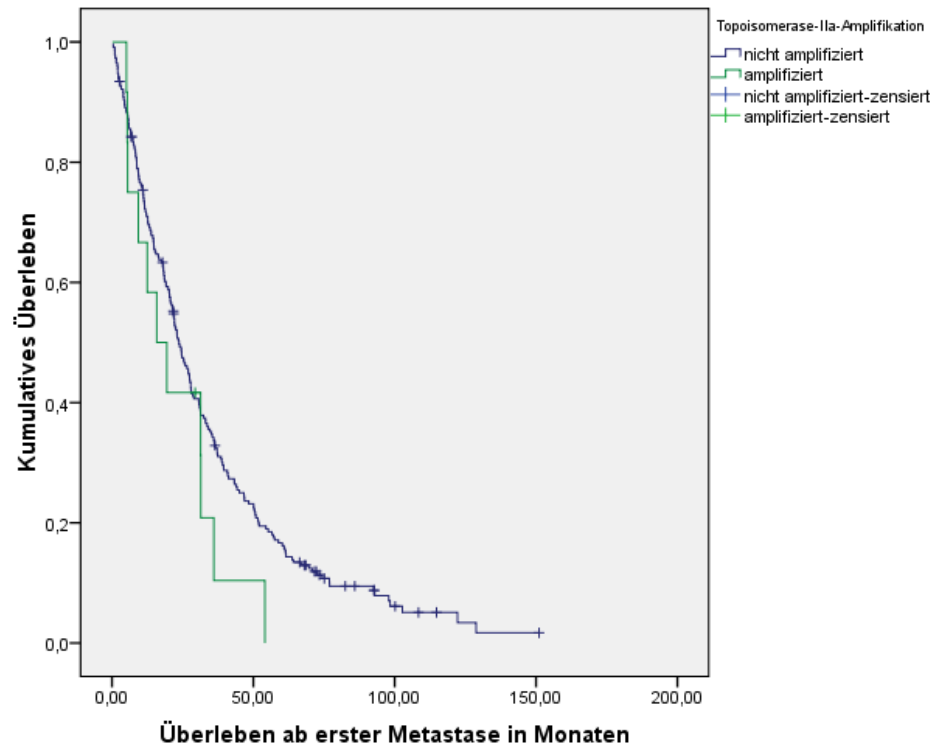


Abbildung 20

Die beiden Kurven zeigen zwar unterschiedliche Verkäufe, die sich durch den erheblichen Unterschied in der Fallzahl erklären (229 nicht amplifizierte Fälle stehen 12 amplifizierten Fällen gegenüber), dennoch ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit (Log-rank-Test: p

= 0,208). Die Mittelwerte des Überlebens betragen für die Patientinnen mit nicht amplifizierten Tumoren 34,3 Monate (Standardabweichung 2,3), für diejenigen mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation 22,0 Monate (Standardabweichung 4,8) Wie bereits erwähnt fanden sich 9 ko-amplifizierte Fälle. Diese zeigten eine mittlere Überlebenszeit von 23,2 Monaten (Standardabweichung 15,08 Monate) und lagen somit geringfügig unter der mittleren Überlebenszeit für das Gesamtkollektiv.

### **Überlebensanalyse unter Berücksichtigung der durchgeführten Therapie**

Wie bereits eingangs in der Einleitung erwähnt, bestehen für Patientinnen mit Mammakarzinom verschiedene Therapieoptionen, welche sich auch nach dem jeweiligen Amplifikationsstatus richten. Für Tumoren, welche eine Her-2/neu-Amplifikation aufweisen, hat sich Trastuzumab (Herceptin) bewährt. Ob eine solche Therapie angewandt wurde oder nicht, schlägt sich auch in den Überlebensstatistiken nieder:

22 der Patientinnen wurden mit Trastuzumab (Herceptin) behandelt, 26 Patientinnen wurden dieser Therapie nicht zugeführt. Es zeigt sich folgende Überlebensstatistik: Das mittlere Überleben liegt bei 42,27 Monaten mit einer Standardabweichung von 32,85 Monaten, einem Minimum von 2,47 Monaten und einem Maximum von 114,84 Monaten. Es zeigt sich also eine erhöhte mittlere Überlebenszeit unter Herceptin-Therapie. Für die 26 nicht mit Trastuzumab behandelten Patientinnen zeigt sich eine deutlich schlechtere

mittlere Überlebenszeit: Mit 14,86 Monaten im Mittel, einer Standardabweichung von 10,38 Monaten, einem Minimum von 0,16 Monaten und einem Maximum von 34,67 Monaten liegen diese Werte weit unter dem des Gesamtkollektivs. Diese Ergebnisse wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf.

## Diskussion

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau, der selten auch bei Männern auftreten kann. Aufgrund der hohen Zahl von Todesfällen ist die Suche nach Wegen, die zu einer früheren Diagnose und Therapie führend, dringend notwendig. Eine auf die individuelle Patientin zugeschnittene Therapie ist nur dann möglich, wenn alle Aspekte der Krankheit bekannt sind und routinemässig analysiert werden. Die Bestimmung des Her-2/neu-Status spielt hierbei seit mehreren Jahren eine wichtige Rolle, seit kurzem ergänzt durch die Analyse der Topoisomerase-II- $\alpha$ . Die Häufigkeit dieser Veränderungen und möglichen Interaktionen zwischen Her-2/neu und der Topoisomerase-II- $\alpha$  sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Auch die Frage, wie diese Marker am sichersten bestimmt werden können, war ein zentraler Teil dieser Studie.

### **Immunohistochemie versus Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

Wie bereits erwähnt, gehört die Bestimmung des Her-2/neu-Status mithilfe der Immunohistochemie (HercepTest™) inzwischen zur Routinediagnostik des Mammakarzinoms. Aus den vorliegenden Daten geht jedoch hervor, dass nicht alle in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) als amplifiziert eingestuften Her-2/neu-Fälle in der Immunohistochemie einem entsprechenden Status zugeordnet werden konnten. Dies zeigt, dass die

---

Methode der Immunohistochemie teilweise falsch negative Ergebnisse liefert und somit Fälle mit Amplifikation nicht erkennt. Neben falsch negativen Ergebnissen besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit einer falschen Positivität. Dies würde bedeuten, dass Tumoren als Her-2/neu-überexprimierend angesehen werden, die in der FISH jedoch keine Amplifikation aufweisen. In der hier vorliegenden Studie ist letzteres für 10 Fälle zutreffend, ersteres für vier (siehe Tabelle 3). Geht man von einer Fallzahl von 158 Tumoren aus, die einem Hercep Test<sup>TM</sup> unterzogen wurden, ergibt sich hierbei somit eine Fehlerquote von 8,86%.

Bereits seit längerem beschäftigt die Frage, ob Immunohistochemie oder Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Methode der Wahl zur Bestimmung des Her-2/neu-Status sein sollte, Forschergruppen aus vielen Ländern. Während eine Studie aus Polen weitestgehend von übereinstimmenden Ergebnissen in Immunohistochemie und FISH berichtet und letzteres vor allem bei in der Immunohistochemie als 2+ gewerteten Fällen empfiehlt (Mrozkowiak et al., 2004), beschreibt eine taiwanische Forschergruppe 17% in der Immunohistochemie falsch positive Fälle (Score 3+ in der Immunohistochemie, jedoch keine Amplifikation in der FISH) und insgesamt 83% der als 3+ gewerteten Tumoren als FISH-positiv. Eine generell hohe Diskordanz wird erwähnt (Kuo et al., 2007). Eine griechische Studie empfiehlt eine Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH) ebenfalls bei einem Score von 2+ in der Immunohistochemie, wobei in dieser Studie die Ergebnisse von CISH und FISH identisch waren (Pothos et al., 2008). Darüber hinaus beschreibt eine andere Studie, dass die Anwendung von zwei

unterschiedlichen Immunohistochemie-Verfahren sinnvoll wäre (Egervari et al., 2008), jedoch sei es möglich, dass durch das parallele Anwenden zweier Verfahren die Kosten ebenso hoch oder gar höher seien als für eine einmalig durchgeführte FISH-Diagnostik. Zwar ist das FISH-Verfahren deutlich teurer als dasjenige der Immunohistochemie (Lidgren et al., 2008), jedoch scheint es der Immunohistochemie überlegen. Zu diesem Schluss kommt auch eine norwegische Forschergruppe, die darüber hinaus angibt, dass das Übersehen von FISH-positiven Fällen einen Einfluss auf das Überleben dieser Patientinnen haben würde, während das Übersehen von Überexpression in der Immunohistochemie keinen negativen Effekt auf das Überleben haben würde. Die FISH sei daher die Methode der Wahl (Sauer et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Immunohistochemie einige Fälle als negativ einstuft, die in der FISH als amplifiziert dargestellt worden wären. Trotz der höheren Kosten und dem vermehrten Zeitaufwand ist daher eine routinemäßige Durchführung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung angezeigt. Zu diesem Schluss kommt auch eine internationale Expertengruppe unter der Federführung von G. Sauter (Sauter et al., 2009). Diese Expertengruppe schreibt, dass die Bestimmung des Her-2/neu-Rezeptorstatus mittels FISH durchgeführt werden sollte. Grund dafür sind vor allem die bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Laboratorien. Auch sei die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung besser mit einem Ansprechen auf Trastuzumab (Herceptin) korreliert.



## Zusammenhang zwischen Amplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$

Wie wir zeigen konnten existieren deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Amplifikation der beiden Gene. 179 Fälle wiesen weder für Topoisomerase-II- $\alpha$  noch für Her-2/neu eine Amplifikation auf. Lediglich neun der 57 Fälle mit Her-2/neu Amplifikation zeigten auch eine Vermehrung der Genkopienzahl, umgekehrt wurde bei 3 von 12 Fällen mit einer Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation keine Her2/neu Veränderung gefunden.

Es ist daher davon auszugehen, dass eine Amplifikation des Her-2/neu-Gens nicht zwingend mit einer Amplifikation des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens vergesellschaftet ist. Jedoch scheint die überwiegende Mehrheit der für Her-2/neu nicht amplifizierten Fälle auch keine Amplifikation bezüglich der Topoisomerase-II- $\alpha$  aufzuweisen. Dies bedeutet, dass sowohl eine Amplifikation im Her-2/neu-Gen *ohne* eine gleichzeitige Amplifikation im Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gen, als auch eine Amplifikation im Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gen *ohne* gleichzeitige Amplifikation im Her-2/neu-Gen möglich und relativ wahrscheinlich ist. Eine Koamplifikation beider Gene hingegen ist auch möglich, war in der vorliegenden Studie jedoch allein in neun Fällen (3,75%) zu verzeichnen. Eine getrennte Analyse der beiden Gene scheint daher unumgänglich, will man den Amplifikationsstatus beider Parameter wissen.

Die Ergebnisse in verschiedenen bisher veröffentlichten Studien sind nicht einheitlich. So beschreibt eine 2005 durchgeführte Studie, dass in 138 mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersuchten Tumoren kein einziger eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation aufwies, wenn nicht auch Her-2/neu amplifiziert war. Insgesamt zeigten 50% der Her-2/neu positiven Tumoren eine Koamplifikation von Topoisomerase-II- $\alpha$  (Hicks et al., 2005). Eine koreanische Studie aus dem Jahr 2006 berichtet von 284 Fällen, von denen 20 eine Amplifikation des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens aufwiesen, während in sechs eine Deletion gefunden wurde. Von diesen insgesamt 26 Fällen lag in 24 eine Her-2/neu-Koamplifikation vor (Park et al., 2006). Unerwähnt bleibt jedoch die Gesamtanzahl der Fälle mit Her-2/neu-Veränderung, sodass ein Vergleich und ein Einschätzen der Relevanz der erwähnten Zahlen schwer möglich sind. Die Autoren einer Studie mit 50 Patientinnen berichten von 11 Fällen mit Her-2/neu-Amplifikation und sechs Fällen mit Veränderung des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens (d.h. Amplifikation oder Deletion), wovon zwei Fälle nicht mit einer Amplifikation von Her-2/neu vergesellschaftet waren. Auch diese Studie wurde mithilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt (Beser et al., 2007). Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass eine Amplifikation des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gens häufiger mit einer Amplifikation des Her-2/neu-Gens einhergeht, jedoch auch ohne diese möglich ist (Mano et al., 2007).

Auch die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten bestätigen diese Hypothese. So sind weisen neun von 60 Fällen mit einer Genamplifikation (15,0%) eine Koamplifikation des anderen untersuchten Gens auf, 51 dieser

Fälle zeigen dies jedoch nicht. Dies stützt die These, dass eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation nicht an diejenige von Her-2/neu gebunden ist, sondern, trotz der Nähe der Gene auf dem Chromosom 17, unabhängig von ihr zu sein scheint. Eine alleinige Bestimmung des Her-2/neu-Status, zum Beispiel zur Abschätzung des Therapieansprechens auf Anthracycline, ist daher nicht ausreichend, da der Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status nicht mit diesem übereinstimmen muss und Abweichungen möglich sind. Neue Tests, z.B. der Firma Abbott, die neben dem Zentromer 17 beide Gene erfassen, sind daher besonders attraktiv, da sie die simultane Analyse beider Parameter in derselben FISH-Untersuchung ermöglichen.

## **Die koamplifizierten Fälle**

Wie bereits dargestellt, ist eine Koamplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  ein Ereignis, das nur selten auftritt. So finden sich unter den 240 vorliegend untersuchten Fällen nur neun mit diesem Phänomen. Dies entspricht lediglich 3,75%. Es stellt sich dennoch die Frage, ob eine Koamplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  Vor- oder Nachteile bezüglich des Überlebens der Patientinnen bietet.

Das gesamte Patientenkollektiv wies eine mittlere Überlebenszeit von 30,58 Monaten mit einer Standardabweichung von 27,23 Monaten auf. Für die neun koamplifizierten Fälle ergibt sich eine mittlere Überlebenszeit von 23,20 Monaten mit einer Standardabweichung von 15,08 Monaten. Hierbei beträgt die mindeste Überlebenszeit 5,39 Monate, die maximale 54,04 Monate (gesamtes Kollektiv: Minimum 0,16 Monate, Maximum 151,09 Monate). Bei

den erwähnten neun koamplifizierten Fällen ist zu erwähnen, dass für Fall 288 keine Verlaufsdaten vorlagen („lost to follow up“). Es fällt also eine große Zeitspanne bezüglich des Überlebens auf, wobei die Patientinnen mit als koamplifiziert klassifizierten Tumoren insgesamt gesehen eine kürzere Überlebenszeit hatten als das Gesamtkollektiv.

Ob jedoch eine Koamplifikation von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  generell mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist, kann nicht pauschal bejaht oder verneint werden. Neben jenen Amplifikationen spielen auch weitere Prognosefaktoren wie histologische Typisierung des Tumors, Grading, TNM-Klassifikation und Therapie entscheidende Rollen. Verschiedene Forschergruppen haben sich intensiv mit diesem Thema beschäftigt, vor allem jedoch mit dem möglichen prognostischen Wert von Topoisomerase-II- $\alpha$ . Auch sie kamen zu keinem einheitlichen Ergebnis. Eine belgische Studie zum Beispiel untersuchte 430 Mammakarzinomproben mithilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf ihre Her-2/neu- und Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation. Die dort als koamplifiziert klassifizierten Fälle zeigten ein besseres Ansprechen auf anthracyclinhaltige Chemotherapie, was vermutlich vorrangig durch die Amplifikation der Topoisomerase-II- $\alpha$  bedingt war (Di Leo et al., 2002). Die Überlebenszeit wird nicht mitgeteilt. Eine in München durchgeführte Studie beschreibt fünf koamplifizierte Fälle bei einer Gesamtzahl von insgesamt sieben Fällen mit Her-2/neu-Amplifikation. Anzumerken ist, dass dies einen auffällig hohen Anteil an Fällen mit Koamplifikation darstellt. Nach einem Follow-Up von durchschnittlich 44 Monaten waren keine signifikanten Unterschiede

bezüglich des Überlebens zu verzeichnen. Dennoch zeigten für Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  amplifizierte Fälle ein längeres rezidivfreies Überleben; nach Ansicht der Autoren scheinen diese Amplifikationen die Wirksamkeit von anthracyclinhaltiger Chemotherapie zu verbessern. (Schindlbeck et al., 2005).

Diese Studien untermauern die Bedeutung der Topoisomerase-II- $\alpha$  als prädiktiven Marker beim Mammakarzinom. Beide Studien zeigen insgesamt niedrige Fallzahlen, im Falle der Studie aus München jedoch mit beträchtlicher Koamplifikation (5 von 7 Her-2/neu positiven Fällen zeigen eine Koamplifikation). Sowohl die belgische als auch die deutsche Forschungsgruppe berichten von einem verbesserten Ansprechen von anthracyclinhaltiger Chemotherapie, so dass dies der entscheidende Faktor bezüglich des Überlebens bei vorhandener Koamplifikation zu sein scheint. Die Münchner Studie berichtet sogar von längerem rezidivfreien Intervallen bei Patientinnen mit Tumoren, die eine Koamplifikation aufwiesen. Auch im Rahmen der hier nun vorliegenden Studie erhielten von den neun Patientinnen, die einen Tumor mit Koamplifikation aufwiesen, acht eine anthracyclinhaltige palliative Chemotherapie. Wie oben angeführt war die Überlebenszeit jedoch für diese Patientinnen geringer als für das Gesamtkollektiv. Der prädiktive Wert der TOP2A-Amplifikation für ein besseres Ansprechen auf eine Anthrazyklinhaltige Chemotherapie gilt somit möglicherweise nicht für die palliative Situation.

Zusätzlich ist zu bedenken, dass neben der Koamplifikation vieler weitere Prognosemarker relevant sind. So spielt zum Beispiel die Metastasierung, die Tumorgröße, das Grading, der histologische Subtyp, die TNM-Klassifikation und die durchgeführte Therapie eine wichtige prognostische Rolle. Die Bestimmung des Amplifikationsstatus und damit die Überprüfung ob eine Koamplifikation vorliegt oder nicht, ist dennoch sinnvoll, da - wie oben erwähnte Studien darlegen - in diesem Falle mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie zu rechnen ist und dies potentiell die Prognose verbessern kann. Obwohl eine Amplifikation des Her-2/neu-Gens bekanntlich mit einem schlechteren Verlauf einhergeht, bedeutet eine Koamplifikation nicht zwingend eine infauste Prognose, vielmehr eröffnet sie die Möglichkeit einer individuell auf die jeweilige Patientin zugeschnittenen Therapie.

Darüber hinaus empfiehlt auch eine tschechische Studie die Durchführung einer Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zur Bestimmung des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikationsgrades bei positiven Befunden in der Immunohistochemie für Her-2/neu (Bouchalova et al., 2006). Ergebnisse einer Untersuchung aus Frankfurt am Main stützen die These, dass Topoisomerase-II- $\alpha$  ein prädiktiver Marker sein kann, besonders im Bezug auf die Wirkung von Anthracyclinen, und dass die Bestimmung zur Risikoabschätzung sinnvoll sein kann (Rody et al., 2008).

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Bestimmung sowohl des Her-2/neu- als auch des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status sinnvoll ist, um eine

Koamplifikation festzustellen. Beide können als prognostisch relevante Marker dienen und bieten in Kombination einen Anhaltspunkt für die optimale Therapie. Eine Koamplifikation an sich scheint jedoch nicht notwendigerweise eine schlechte Prognose, beziehungsweise Überlebensvorteile oder –nachteile, zu bedeuten.

## **Die nicht amplifizierten Fälle**

Neben der Gruppe der koamplifizierten Fälle bilden die Fälle, die weder für Her-2/neu noch für Topoisomerase-II- $\alpha$  eine Veränderung aufwiesen, die größte Gruppe. Es handelt sich hierbei um 179 Fälle mit einer mittleren Überlebenszeit von 31,92 Monaten (Standardabweichung 28,10 Monate) und einem Minimum von 0,99 Monaten, beziehungsweise einem Maximum von 151,09 Monaten. Diese Verteilung zeigt eine lediglich minimal längere mittlere Überlebenszeit als das Gesamtkollektiv. Diese Konstellation trifft wohl auf die meisten Brustkrebspatientinnen zu. Eine Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin®) ist bei diesen Patientinnen nicht angezeigt. Hier kommen andere Therapien entsprechend der S3-Leitlinie zur Anwendung, wobei es sich in den meisten Fällen um low- oder medium-risk-Karzinome handelt. In der Untersuchung von Fritz et al. (2005) wiesen Patientinnen, in deren Tumoren weder eine Her-2/neu-, noch eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation nachgewiesen werden konnte, die längste Überlebenszeit auf. Dies wird auch durch die eigene Beobachtung im vorliegenden Untersuchungskollektiv gestützt, dass die in diese Gruppe fallenden

Patientinnen am längsten überlebten, wenngleich der Unterschied zum Gesamtkollektiv sehr klein ausfällt.

Diese Gruppe bildet die Hauptgruppe aller Mammakarzinome. Das Fehlen einer Her-2/neu-Überexpression ist prognostisch günstig. Jedoch ist davon auszugehen, dass unter Umständen eine anthracyclinhaltige Chemotherapie nicht denselben Erfolg hat wie bei Tumoren mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation.

## **Die unterschiedlich amplifizierten Fälle**

Als dritte Gruppe lassen sich diejenigen Präparate zusammenfassen, die entweder eine Her-2/neu-Amplifikation bei gleichzeitig fehlender Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation aufwiesen oder umgekehrt. Diese Gruppe besteht aus zwei Untergruppen: Untergruppe 1 umfasst 48 Fälle, bei denen eine Amplifikation für Her-2/neu vorlag, während das Topoisomerase-II- $\alpha$ -Gen nicht verändert war. Die mittlere Überlebenszeit liegt für dieses Kollektiv bei 27,42 Monaten bei einer Standardabweichung von 27,02 Monaten, einem Minimum von 0,16 Monaten und einem Maximum von 114,84 Monaten. Gegenüber dem Gesamtkollektiv ist die mittlere Überlebenszeit minimal vermindert, möglicherweise aufgrund der Her-2/neu-Amplifikation. Eine Möglichkeit, die Überlebenszeit positiv zu beeinflussen, besteht bei Patientinnen mit dieser Konstellation in der Gabe des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®). In den von uns



analysierten Fällen fand in 22 Fällen (45,8%) eine Therapie mit diesem Antikörper statt, 26 Patientinnen wurden keiner Therapie mit Herceptin® unterzogen. Trotz der generell als schlecht geltenden Prognose zeigt die Gruppe, die einer Antikörper-Therapie unterzogen wurde, eine bessere Überlebenszeit als das Gesamtkollektiv: Das mittlere Überleben liegt bei 42,27 Monaten mit einer Standardabweichung von 32,85 Monaten, einem Minimum von 2,47 Monaten und einem Maximum von 114,84 Monaten. Dies unterstreicht die Beobachtungen aus anderen Studien, dass eine Antikörpertherapie eine positive Auswirkung auf das Überleben der Patientinnen mit einem Her-2/neu-amplifizierten Tumor hat (Dahabreh et al., 2008).

Diese Zahlen stützen erneut die These, dass eine Therapie mit Trastuzumab für Patientinnen mit Her-2/neu-überexprimierenden Tumoren einen großen Benefit bringt und die mittlere Überlebenszeit deutlich verlängert. Dies haben, wie bereits in der Einleitung erwähnt, diverse Studien belegt (Quellen anführen).

Neben der Gruppe mit vorhandener Her-2/neu-Amplifikation und fehlender Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation gibt es noch eine sehr kleine zweite Untergruppe, die eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Überexpression aufweist, aber keine Her-2/neu-Amplifikation. Lediglich drei Patientinnen wiesen im ersten Durchgang der Auswertung Tumoren mit dieser Merkmalskonstellation auf. Bei erneuter Kontrolle dieser drei Fälle war jedoch eines der Präparate kaum noch auswertbar; die noch analysierbaren Zellen wiesen keine Amplifikation

auf, sodass eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation in diesem Fall nicht endgültig bewiesen ist. Die Überlebenszeiten ab erster Metastase der Patientinnen mit gesicherter Amplifikation betragen 5,16 und 5,53 Monate. Im dritten – unklaren – Fall fand sich eine Überlebenszeit von 36,02 Monaten. Aufgrund der kleinen Fallzahl kann nicht entschieden werden, ob die Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation der entscheidende Faktor für das relativ kurze Überleben war. Alle drei Frauen erhielten als palliative Chemotherapie Anthracycline, die Patientin mit einer Überlebenszeit von 36,02 Monaten und unklarem Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status zusätzlich eine palliative Hormontherapie, deren Einfluss schwer abschätzbar ist. Betrachtet man die zwei Patientinnen mit gesicherter Amplifikation von Topoisomerase-II- $\alpha$ , so scheint diese Veränderung der Topoisomerase-II- $\alpha$  eher eine schlechte Prognose mit kürzeren Überlebenszeiten zu bedeuten.

Diverse Studien mit verschiedenen Patientenzahlen aus unterschiedlichen Ländern definieren die Topoisomerase-II- $\alpha$  als Marker für eine schlechte Prognose. Jedoch beziehen sich diese Studien meist auf Tumoren, die auch Alterationen im Her-2/neu-Gen aufweisen. Eine amerikanische Studie gibt an, dass eine Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation zusätzlich zur Her-2/neu-Amplifikation mit einem aggressiven Verlauf des Mammakarzinoms einhergeht (Depowski et al., 2000). Forscher aus Griechenland kamen zu ebenjenem Ergebnis und berichten von einer Assoziation zwischen Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation und positivem Nodalstatus (Kalogeraki et al., 2005). Eine dänische Studie hingegen beschreibt ein besseres Überleben für Patientinnen mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation, sofern diese einer

epirubicinhaltigen Chemotherapie unterzogen wurden (Knoop et al., 2005). Mindestens drei Untersuchungen beschreiben einen Zusammenhang von Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation und dem verbesserten Ansprechen auf anthracyclinhaltige Chemotherapien (Hicks et al., 2005; Arriola et al., 2007; Nielsen et al., 2008). Darüber hinaus erwähnt eine dieser Studien einen Zusammenhang zwischen Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation und positivem Östrogen-Rezeptorstatus. Alle diese Tumoren wiesen auch eine Her-2/neu-Amplifikation auf (Arriola et al., 2007).

Die Zusammenschau all dieser Studien spricht dafür, dass eine Amplifikation der Topoisomerase meist mit einer Her-2/neu-Amplifikation assoziiert zu sein scheint und auf eine schlechte Prognose hinweist. Dies würde implizieren, dass eine Bestimmung des Topoisomerase-Status überflüssig wäre, sobald der genaue Her-2/neu-Status feststeht. Dass dies nicht der Fall ist, zeigt die hier vorliegende Studie, in der dies auf zwei beziehungsweise drei Fälle nicht zutrifft. Auch ein türkisches Forscherteam kommt nicht zu diesem Ergebnis und beschreibt Topoisomerase-II- $\alpha$ -Deletionen in Tumoren, die keine Veränderungen des Her-2/neu-Status aufwiesen (Beser et al., 2007). Wird der Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status nicht bestimmt, können wesentliche tumorgenetische Informationen übersehen werden, welche eine Individualisierung der Chemotherapie ermöglichen. Prognostisch scheint die Topoisomerase-II- $\alpha$  tatsächlich ungünstig zu sein, da nicht nur die Patientinnen in der hier vorliegenden Studie, sondern auch in denjenigen, die weiter oben Erwähnung finden, geringe Überlebenszeiten hatten.

Eine Bestimmung des Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status *und* des Her-2/neu-Status mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ist sinnvoll. Sie ist ein bedeutsamer Schritt auf dem Weg zu einer Individualisierung der Mammakarzinomtherapie und geht mit der Hoffnung einher, auf diese Weise die Mortalität weiter senken und die Prognose der betroffenen Frauen erheblich verbessern zu können.

## Literaturverzeichnis

- Statistisches Bundesamt, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
  
- Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Enge JI, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzel D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, von Minckwitz G, Naß-Griegoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreer I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J, Zemmler T  
  
*Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*  
  
Informationszentrum für Standards in der Onkologie, Berlin
  
- Haag P, Hanhart N, Müller M  
  
*Gynäkologie und Urologie – Für Studium und Praxis 2006*  
  
Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
  
- Michaelson JS, Satija S, Kopans D, Moore R, Silverstein M, Comegno A, Hughes K, Taghian A, Powell S, Smith B  
  
*Gauging the Impact of Breast Carcinoma Screening in Terms of Tumour Size and Death Rate*  
  
Cancer 2003;98:2114–24.

- Christiansen P, Friis E, Balslev E, Jensen D, Møller S, Danish Breast Cancer Cooperative Group  
*Sentinel node biopsy in breast cancer: five years experience from Denmark.*  
Acta Oncol. 2008;47(4):561-8.
  
- Singletary ES, Allred C, Ashley P  
*Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer.*  
J Clin Oncol 2002; 220: 3628–36.
  
- Kongressbericht: St. Gallen Konsensuskonferenz 2007  
Brustkrebs Deutschland e.V., Kongressbericht „Konsensusmeeting St. Gallen 2007“
  
- Kalogeraki A, Ieromonachou P, Kafousi M, Giannikaki E, Vrekoussis T, Zoras O, Tsiftsis D, Delides G, Stathopoulos E  
*Topoisomerase II alpha expression in breast ductal invasive carcinomas and correlation with clinicopathological variables.*  
In Vivo. 2005 Sep-Oct;19(5):837-40.
  
- Koren R, Rath-Wolfson L, Ram E, Itzhac OB, Schachter B, Klein B, Gal R, Dreznik Z  
*Prognostic value of Topoisomerase II in female breast cancer.*  
Oncol Rep. 2004 Oct;12(4):915-9.
  
- Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS

*Topoisomerase II Expression in Breast Cancer: Correlation with Outcome Variables*

Mod Pathol 2000;13(5):542-547

- Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MB, Jones RL, James M, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS

*Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer.*

Breast Cancer Res Treat. 2007 Dec;106(2):181-9. Epub 2007 Jan 27.

- Mano MS, Rosa DD, De Azambuja E, Ismael GF, Durbecq V

*The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours.*

Cancer Treat Rev. 2007 Feb;33 (1):64-77. Epub 2006 Nov 17.

- Nielsen KV, Ejlersen B, Møller S, Jørgensen JT, Knoop A, Knudsen H, Mouridsen HT

*The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D.*

Acta Oncol. 2008;47(4):725-34.

- Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B

*HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy.*

J Clin Oncol. 2008 Feb 10;26(5):736-44.

- Villman K, Sjöström J, Heikkilä R, Hultborn R, Malmström P, Bengtsson MO, Sönderberg M, Saksela E, Blomqvist C

*TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer.*

Acta Oncol. 2006;45(5):590-6.

- Arriola E, Marchio C, Tan DS, Drury SC, Lambros MB, Natraian R, Rodriguez-Pinilla SM, Mackay A, Tamber N, Fenwick K, Jones C, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS

*Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines.*

Lab Invest. 2008 May;88(5):491-503. Epub 2008 Mar 10.

- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Baiaomonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L

*Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.*

N Engl J Med 2001 Mar 15;344(11):783-92.

- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Tomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD, Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team

*Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.*

N Engl J Med 2005 Oct 20;353(16):1659-72.



- Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S

*Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.*

Oncologist. 2008 Jun;13(6):620-30.

- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N

*Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.*

N Engl J Med 2005 Oct 20;353(16):1673-84.

- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF

*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.*

Arch Pathol Lab Med. 2007 Jan 1;131(1):18

- Mrozkowiak A, Olszewski WP, Piaścik A, Olszewski WT

*HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results.*

Pol J Pathol. 2004;55(4):165-71.

- Kuo SJ, Wang BB, Chang TS, Chen TH, Yeh KT, Lee DJ, Yin PL, Chen M

*Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment for HER-2/neu status in Taiwanese breast cancer patients.*

Taiwan J Obstet Gynecol. 2007 Jun;46(2):146-51.

- Pothos A, Plastira K, Plastiras A, Vlachodimitropoulos D, Goutas N, Angelopoulou R

*Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma.*

Acta Histochem Cytochem. 2008 Jun 27;41(3):59-64.

- Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z

*Immunohistochemical antibodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study.*

Tumour Biol. 2008;29(1):18-27. Epub 2008 May 23.

- Lidgren M, Wilking N, Johnsson B, Rehnberg C

*Cost-effectiveness of HER2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer.*

Acta Oncol. 2008 Feb 1:1-11. [Epub ahead of print]

- Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christesen H, Karesen R

*Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice?*

APMIS. 2003 Mar;111(3):444-50.

- Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, Swain E, Tarr S, Hartke M, Skacel M, Crowe JP, Budd GT, Tubbs RR  
*The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study.*  
Hum Pathol. 2005 Apr;36(4):348-56.
  
- Park K, Han S, Gwak GH, Kim HJ, Kim J, Kim KM  
*Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer.*  
Breast Cancer Res Treat. 2006 Aug;98(3):337-42. Epub 2006 Feb 24.
  
- Beser AR, Tuzlali S, Guzey D, Dolek Guler S, Hacıhanefioglu S, Dalay N  
*HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer.*  
Pathol Oncol Res. 2007;13(3):180-5. Epub 2007 Oct 7.
  
- Di Leo A, Gancberg C, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, Dolci S, Leroy JY, Paesmans M, Isola J, Piccart MJ  
*HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil.*  
Clin Cancer Res. 2002 May;8(5):1107-16.
  
- Schindlbeck C, Janni W, Shabani M, Kornmeier A, Rack B, Rjosk D, Gerber B, Braun S, Sommer H, Friese K

*Isolated tumor cells in the bone marrow (ITC-BM) of breast cancer patients before and after anthracyclin based therapy: influenced by the HER2- and Topoisomerase IIalpha-status of the primary tumor?*

J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Aug;131(8):539-46. Epub 2005 May 11.

- Bouchalová K, Trojanec R, Kolár Z, Cwiertka K, Cernáková I, Mihál V, Hajdúch M

*Analysis of ERBB2 and TOP2A gene status using fluorescence in situ hybridization versus immunohistochemistry in localized breast cancer.*

Neoplasma. 2006;53(5):393-401.

- Rody A, Karn T, Ruckhäberle E, Müller V, Gehrman M, Solbach C, Ahl A, Gähje R, Holtrich U, Kaufmann M

*Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer.*

Breast Cancer Res Treat. 2008 Mar 14. [Epub ahead of print]

- Fritz P, Cabrera CM, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky WE, van der Kuip H

*c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study.*

Breast Cancer Res. 2005;7(3):R374-84. Epub 2005 Mar 21.

- Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdóttir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlertsen B, Danish Breast Cancer Cooperative Group

*retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide,*

*methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil:  
Danish Breast Cancer Cooperative Group.*

J Clin Oncol. 2005 Oct 20;23(30):7483-90.

- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF

*Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and  
methodologic considerations.*

J Clin Oncol. 2009 Mar 10;27(8):1323-33. Epub 2009 Feb 9

## Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen der weiblichen Brust rangieren in Deutschland unter den zehn häufigsten Todesursachen. Die verschiedenen Therapieoptionen verfolgen entweder kurative oder palliative Ziele und richten sich wesentlich nach klinisch-pathologischen Parametern wie der TNM-Klassifikation, dem Tumor-Grading, dem Befund der Sentinellymphknotenbiopsie, Hormonrezeptor-Status und dem Her-2/neu-Status, der mittels Immunohistochemie oder Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bestimmt werden kann. Das Wissen um den Her2/neu Status erlaubt eine Entscheidung für oder gegen die Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), welcher der Patientin nur bei vorhandener Amplifikation des Her-2/neu-Gens Vorteile bietet. Auch dem Enzym Topoisomerase-II- $\alpha$  wird immer mehr Bedeutung bezüglich Prognose und Therapieentscheidungen beim Mammakarzinom zugesprochen.

In der vorliegenden Studie wurden 242 metastasierte Mammakarzinome von Frauen zwischen 25 und 80 Jahren (52,92 +/-11,1 Jahre) bezüglich ihrer Amplifikation des Her-2/neu-Gens anhand der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. Von demselben Kollektiv wurden 241 Tumoren anhand derselben Methode bezüglich ihres Topoisomerase-II- $\alpha$ -Status analysiert. Die Durchführung der FISH folgte einem standardisierten Protokoll. Darüber hinaus wurde von 160 Proben ein Her-2/neu-Status mittels Immunohistochemie erstellt.

Bezüglich der Her-2/neu konnten 184 (76.0%) nicht amplifizierte und 57 (23.6%) amplifizierte Fälle identifiziert werden. Lediglich 1 Fall musste als unklar (borderline positiv) klassifiziert werden. Bezüglich der Topoisomerase-II- $\alpha$  fanden sich 229 (95.0%) nicht amplifizierte und 12 (5.0%) amplifizierte Fälle, kein unklarer Fall. Koamplifikation der beiden Marker konnte in lediglich 9 Fällen gefunden werden. 48 Fälle zeigten eine Her-2/neu-Amplifikation bei fehlender Topoisomerase-II- $\alpha$ -Veränderung, während dies vice versa nur für 3 Fälle zutreffend war. In 179 Tumoren war weder Her-2/neu-, noch Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation zu verzeichnen. Zwar ergab sich eine große Übereinstimmung der FISH- und Immunohistochemieergebnisse bezüglich des Her-2/neu-Status, jedoch ließ sich in insgesamt 10 Fällen, die in der IHC als 3+ bewertet wurden, keine Amplifikation des Her-2/neu-Gens in der FISH nachweisen (falsch positive Bewertung durch IHC) und 4 Fälle wurden in der IHC als 0 bewertet, wiesen jedoch in der FISH eine eindeutige Amplifikation auf (falsch negatives Ergebnis der Immunohistochemie). Des Weiteren wurden die untersuchten Fälle mit den klassischen Prognosefaktoren für das Mammakarzinom korreliert. Die mittlere Überlebenszeit ab erster Metastase betrug 30.6 Monate (+/- 27.3 Monate). Patientinnen mit Her-2/neu-Amplifikation überlebten im Mittel 34.6 Monate (+/- 2.6 Monate), diejenigen mit Tumoren ohne Amplifikation 29.4 Monate (+/- 4.0 Monate). Für Topoisomerase-II- $\alpha$  ergaben sich Werte von 34.4 Monate (+/- 2.3 Monate) für nicht amplifizierte Tumoren und 22.0 Monate (+/- 4.8 Monate) für amplifizierte Fälle. Bei Koamplifikation lag das mittlere Überleben bei 23.2 Monaten (+/- 15.08

Monate); die 2 Patientinnen mit vorhandener Amplifikation für Topoisomerase-II- $\alpha$ , aber fehlender Her-2/neu-Veränderung überlebten 5.16 Monate, bzw. 5.53 Monate. In einem 3. solchen Fall war eine Überlebenszeit von 36.02 Monaten zu verzeichnen, jedoch konnte der Amplifikationsgrad in einer 2. Kontrolle nicht bestätigt werden.

Genetische Veränderungen von Her-2/neu und Topoisomerase-II- $\alpha$  scheinen nicht zwingend miteinander gekoppelt zu sein, eine Bestimmung beider Marker ist daher bei einer zeitgemässen genetischen Tumoranalyse unumgänglich. Koamplifikation der beiden Gene ist nach den vorliegenden Daten mit einem verkürzten Überleben assoziiert. Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass neben dem Amplifikationsstatus auch die üblichen Prognosefaktoren und die Art der Therapie eine entscheidende Rolle für die Prognose der Patientinnen spielen. Her-2/neu-amplifizierte Tumoren sind, sofern sie nicht einer Therapie mit Trastuzumab (Herceptin) unterzogen werden, in der Regel mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Die Bestimmung dieses Markers ermöglicht die Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®), welches die Prognose der betroffenen Patientinnen verbessern kann. Auch bei 22 von 57 (38.59%) Patientinnen dieser Studie mit einer Überexpression von Her-2/neu wurde Trastuzumab eingesetzt, was die mittlere Überlebenszeit deutlich verbesserte. Die Gruppe mit Tumoren mit Topoisomerase-II- $\alpha$ -Amplifikation ohne Her-2/neu-Überexpression zeigte das kürzeste Überleben. Topoisomerase-II- $\alpha$ -Veränderungen ohne Amplifikation von Her-2/neu könnten ein Marker für eine besonders ungünstige Prognose zu sein. Anthracycline könnten für



diese Patientinnen eine Therapieoption darstellen, eine Bestimmung des Amplifikationsstatus scheint daher sinnvoll. Betrachtet man abschließend die Zahl der falsch negativen und der falsch positiven Ergebnissen der Her2/neu-Immunohistochemie, so ist die Her2/neu-FISH-Analyse eindeutig dieser Untersuchung überlegen und sollte standardmäßig angewandt werden.



---

# Danksagung

Hier sei all jenen Menschen gedankt, die diese Arbeit ermöglicht und begleitet haben:

Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner für die Möglichkeit, die Arbeit am Pathologischen Institut der LMU München absolvieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Diebold für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung aus der Schweiz.

Frau PD Dr. Doris Mayr für die freundschaftliche Betreuung und für einen kühlen Kopf in Krisensituationen.

Frau Beate Luthardt für die Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank denjenigen, die immer an meiner Seite sind: Danke meinen Eltern Michael und Mechthild für ihre bedingungslose Unterstützung auf meinem Lebensweg. Danke meinem Bruder Daniel, dem besten großen Bruder, den man sich wünschen kann – ohne Dich wär's nicht dasselbe. Danke meinen Großeltern und allen, die Teil meines Lebens sind. Ohne Euch alle wäre das hier nicht möglich gewesen.

Koblenz, im Februar 2011