

Aus der Klinik für Allgemein-,
Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. J. Werner

Tumorbiologische Wertigkeit von HER2/neu beim primären und hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom



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

vorgelegt von
Thomas Christian Singer
aus
München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Barbara Mayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst
Priv. Doz. Dr. Ulrich Andergassen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2017

*Meinem Großvater L. Cellard,
Colonkarzinompatient*

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Aktuelle Behandlungsmethoden des primären und metastasierten kolorektalen Karzinoms	1
1.2. HER2/neu als Zielmolekül in der Krebstherapie	2
1.3. Die HER2/neu-Tumorbiologie	5
1.3.1. HER2/neu	5
1.3.2. Der HER-Pathway	6
1.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	8
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Material	11
2.1.1. Untersuchungsgut und klinisch-pathologischen Daten	11
2.1.2. Antikörper	12
2.1.3. Zelllinien	14
2.1.4. Reagenzien und Chemikalien	15
2.1.5. Lösungen und Antikörpersubstanzen	15
2.2. Methoden	17
2.2.1. Einfrieren von Gewebe	17
2.2.2. Anfertigen von Gefrierschnitten	17
2.2.3. Anfertigen von Zytospinpräparaten	18
2.2.4. Kry-immunhistochemie	18
2.2.5. Auswertung	19
2.2.6. Auswertung der HER2/neu-Präparate	21
2.3. Statistik	23
2.4. Weitere Untersuchungsverfahren	24
2.4.1. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	24
2.4.2. Paraffinimmunhistochemie	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1. Patientencharakterisierung	25
3.2. Methodische Etablierungsphase	27
3.2.1. Vergleich der verschiedenen HER2/neu-Antikörper untereinander	27
3.2.2. Vergleich Kryo- mit Paraffinimmunhistologie	35
3.2.3. Vergleich Immunhistochemie (IHC) mit Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	40

	Seite
3.3. HER2/neu beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom	41
3.3.1. HER2/neu-Expression in benigner tumorferner Kolonmukosa	41
3.3.2. HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom	42
3.3.3. HER2/neu-Expression in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome	43
3.3.4. Gegenüberstellung der spezifischen HER2/neu-Expressionen in allen drei Gewebearten	45
3.3.5. HER2/neu-Expression in primären kolorektalen Karzinomen und autologer benigner Kolonmukosa	48
3.3.6. HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom und autologer synchroner Lebermetastase	50
3.3.7. Korrelation der HER2/neu-Expression mit klinisch-pathologischen Daten	51
3.3.8. Korrelation der HER2/neu-Expression mit weiteren Biomarker	53
4. DISKUSSION	57
4.1. Methodendiskussion	57
4.1.1. Auswahl des HER2/neu-Antikörpers	57
4.1.2. Immunhistochemische Verfahren	62
4.1.3. HER2/neu-Auswertung beim kolorektalen Karzinom	65
4.1.4. Bedeutung der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	70
4.2. Das HER2/neu-Expressionsprofil	74
4.2.1. HER2/neu auf benignem mukösem Referenzgewebe	74
4.2.2. HER2/neu beim primären kolorektalen Karzinom	77
4.2.3. HER2/neu auf kolorektalen Lebermetastasen	83
4.3. Korrelationen der HER2/neu-Expression mit klinisch-pathologischen Daten und ausgewählten Biomarkern sowie dessen tumorbiologischen Wertigkeit	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	91
6. REFERENZEN UND LITERATUR	93
7. DANKSAGUNG	107
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	109
9. ERKLÄRUNG	111

Abkürzungsverzeichnis

®	<i>Registered Trademark</i> , geschützten Handelsnamen
°C	Grad Celcius
%	Prozent
5-FU	5-Fluorouracil
µm	Mikrometer
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Arbeitskonzentration
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (unabhängiger gemeinnütziger Verwahrungsort von Zelllinien)
BCSS	<i>Breast Cancer Scoring System</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	<i>chromosome enumeration probe</i>
cm	Zentimeter
cM	Metastasierungsstatus nach klinischen Daten (c für <i>clinical</i> , TNM-Klassifikation)
DM1	Maytansin-Derivat 1, Wirkstoff im Antikörper-Wirkstoff-Konjugat T-DM1
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ErbB	Gensymbol der HER-Familie, abgeleitet von <i>erythroblastic leukemia viral oncogene</i>
et al.	<i>et alia</i> für "und andere"
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FOLFIRI	5-Fluorouracil/Folinsäure und Irinotecan (Chemotherapiekombination)
FOLFOX	5-Fluorouracil/Folinsäure und Oxaliplatin (Chemotherapiekombination)
FS	Folinsäure
GCSS	<i>Gastric Cancer Scoring System</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen-D related</i>
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
KCl	Kaliumchlorid
kD	kiloDalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki67-LI	<i>Ki67-Labeling Index</i>
Konz.	Konzentration
L	<i>Lymphangiosis carcinomatosa</i> , sprich Lymphgefäßinvasion (TNM-Klassifikation)
LSAB	<i>Labelled Streptavidin-Biotin</i>
M	Metastasenstatus (TNM-Klassifikation)
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
n	Fallzahl
N	<i>Node</i> für Lymphknoten, Lymphknotenstatus (TNM-Klassifikation)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Pn	Perineurale Invasion (TNM-Klassifikation)

Abkürzungsverzeichnis

pN	Lymphknotenstatus vom Pathologen erhoben (TNM-Klassifikation)
POX	Peroxidase
pT	Tumorstadium vom Pathologen erhoben (TNM-Klassifikation)
R	Residual (TNM-Klassifikation)
RAS	<i>Rat sarcoma</i> , Protooncogen
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SISH	<i>Silver In Situ Hybridization</i>
T	Tumorstatus, Infiltrationstiefe des Tumors (TNM-Klassifikation)
T-DM1	Trastuzumab Emtansin
TMA	<i>Tissue-Microarrays</i>
TNM	Klassifikation des Tumorstadiums, zusammengesetzt aus T (Tumor), N (<i>Node</i>) und M (Metastase)
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Gefäßinvasion (TNM-Klassifikation)
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
Verd.	Verdünnung
vs.	versus

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1	Flussdiagramme zur Indikationsstellung einer Trastuzumab-Therapie
Abbildung 2	Der HER-Pathway und aktuelle anti-HER2/neu-Therapeutika
Abbildung 3	Avidin-Biotin-Komplex (ABC) nach der <i>Labelled Streptavidin-Biotin</i> -Methode (LSAB)
Abbildung 4	Flußdiagramm zur gesonderten HER2/neu-Auswertung
Abbildung 5	Repräsentative Gewebeschnitte von kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen
Abbildung 6	Bland-Altman-Plot für Prozent spezifischer membranöser Epithelzellfärbung (4B5 vs. CB11)
Abbildung 7	Direkte Gegenüberstellung der drei Antikörper auf gleiches repräsentatives Gewebeareal
Abbildung 8	Vergleich Kryo- versus Paraffinhistologie, Ergebnisse im Koordinatensystem
Abbildung 9	Vergleich Kryo- versus Paraffinhistologie, Ergebnisse im Bland-Altman-Plot
Abbildung 10	HER2/neu-Expressionsprofil anhand des 4B5-Antikörpers für alle drei Gewebearten
Abbildung 11	Vergleich der HER2/neu-Expression auf dem Primärtumor mit der autologen gutartigen Mukosa
Tabelle 1	Auswertkriterien der HER2/neu-Untersuchungen beim Mamma- und Magenkarzinom
Tabelle 2	Zelltypische und HER2/neu-spezifische Antikörper
Tabelle 3	Übersicht der Negativkontrollantikörper und Seren
Tabelle 4	Zelllinien für Zytospinpräparate als Positivkontrolle der Antikörper
Tabelle 5	Zellliniencharakterisierung
Tabelle 6	Reagenzien und Chemikalien
Tabelle 7	Patientencharakterisierung
Tabelle 8	Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv CB11 vs. N12
Tabelle 9	Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters von CB11 und N12
Tabelle 10	Gesamtergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit den Klonen CB11 und N12
Tabelle 11	Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv CB11 vs. 4B5
Tabelle 12	Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters von CB11 und 4B5
Tabelle 13	Ergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit den Klonen CB11 und 4B5 am Vergleichskollektiv
Tabelle 14	Färbeeigenschaften der drei HER2/neu-Antikörper auf verschiedene nicht epitheliale Zelltypen
Tabelle 15	Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv Kryo- vs. Paraffinimmunhistologie
Tabelle 16	Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters beider immunhistologischen Verfahren
Tabelle 17	Vergleich der spezifischen Ergebnisse von Kryo- und Paraffinhistologie
Tabelle 18	Vergleich der Fallzahlen spezifisch positiver Gewebe bei der Kryo- und Paraffinhistologie
Tabelle 19	Vergleich der spezifischen Färbeergebnisse von Kryo- und Paraffinhistologie
Tabelle 20	Ergebnisse der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) und 4B5-Kryoimmunhistologie (IHC) in allen drei Gewebearten
Tabelle 21	Detail der vier Fälle mit positiven FISH-Quotienten
Tabelle 22	Unterteilung des Lebermetastasen-Kollektivs in unbehandelte und vorbehandelte Patienten
Tabelle 23	Korrelationen zwischen HER2/neu-Status der Lebermetastase und einer vorausgegangener Chemotherapie des Primärtumors
Tabelle 24	Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters am Gesamtkollektiv
Tabelle 25	Ergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit dem Klon 4B5 am Gesamtkollektiv
Tabelle 26	Ergebnisse der HER2/neu-Expression mit dem Klon 4B5 nach Magenkarzinomrichtlinien
Tabelle 27	Unterschiede zwischen Primärtumor und autologer Mukosa
Tabelle 28	Korrelationen zwischen mit 4B5 erhobene HER2/neu-Expression und Score aus autologer benigner tumorfernen Kolonmukosa und kolorektalen Primärtumoren
Tabelle 29	Vier Fälle mit allen drei Gewebearten aus einem Patienten (synchrone Lebermetastasen)
Tabelle 30	Korrelation der HER2/neu-Expression (anhand des Antikörper 4B5) im kolorektalen Primärtumor mit den klinisch-pathologischen Faktoren
Tabelle 31	Korrelation der HER2/neu-Expression (Klon 4B5) in den Lebermetastasen mit den klinisch-pathologischen Faktoren
Tabelle 32	Korrelationen von HER2/neu-Expression (erhoben mit Klon 4B5) in der tumorfernen gesunden Mukosa mit verschiedenen Biomarkern
Tabelle 33	Korrelationen von HER2/neu-Expression (4B5-Klon) mit verschiedenen Biomarkern im kolorektalen Primärtumor
Tabelle 34	Korrelationen von HER2/neu-Expression (4B5-Klon) mit verschiedenen Biomarkern in kolorektalen Lebermetastasen
Tabelle 35	HER2/neu-Nachweishäufigkeit und Score 3+ Gewebe entsprechend der unterschiedlichen Auswertungen
Tabelle 36	Übersicht der Publikationen über die HER2/neu-Expression im kolorektalen Karzinom

1. EINLEITUNG

1.1. Aktuelle Behandlungsmethoden des primären und metastasierten kolorektalen Karzinoms

Im Vordergrund der Behandlung des primären und metastasierten kolorektalen Karzinoms steht bei bestehender Operabilität des Tumors und des Patienten, die radikalchirurgische, vollständige Resektion des Tumors mit kurativer Zielsetzung. Mit Hilfe präoperativer Diagnostik und genauer Operationsplanung, sollte eine komplette Entfernung im Gesunden des Primärtumors oder der Metastase angestrebt werden (R0-Resektion)¹.

Die Weiterbehandlung richtet sich anschließend nach dem postoperativen histopathologischen Befund und somit dem Tumorstadium nach UICC (*Union internationale contre le cancer*)^{1,2}. Während ein kurativ reseziertes Kolonkarzinom im UICC-Stadium I (pT1/pT2, pN0, M0 nach der TNM-Klassifikation²) keine weitere medikamentöse Therapie benötigt, wird ein Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie ab UICC-Stadium II (pT3/pT4, pN0, M0) bereits diskutiert¹.

Ab einem positiven Lymphknotenstatus (pN1/pN2, sprich UICC-Stadium III) sowie im metastasierten Stadium (UICC-Stadium IV) ist eine Chemotherapie indiziert und eine Verlängerung des progressionsfreien Überleben durch diese nachgewiesen¹. In der Erstlinientherapie haben sich zwei Chemotherapieschemata als gleichwertig erwiesen: die Kombination aus 5-Fluorouracil/Folinsäure (5-FU/FS) und Oxaliplatin (FOLFOX) einerseits sowie 5-FU/FS und Irinotecan (FOLFIRI) andererseits^{1,3}.

Zu den erwähnten klassischen Chemotherapeutika kommen bei strenger Indikationsstellung monoklonale Antikörper zum Einsatz⁴. Seit dem Jahre 2005 ist Bevacizumab als Antikörper gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und somit als Angiogenesehemmstoff zugelassen. Eine Hinzunahme des Antikörpers zu der Standardchemotherapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom zeigte ein signifikant verlängertes Überleben (20,3 Monate in Kombination versus 15,6 ohne Bevacizumab nach Hurwitz et al., 2004)^{5,6,7}. Im Jahre 2008 kam die Zulassung für die Antikörper Cetuximab und Panitumumab, beide spezifisch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (oder HER1, siehe 1.3.1., Seite 5) bindend¹. Indikationsstellend hat sich über die Jahre der vollständige RAS-Wildtyp Mutationsstatus (*pan-RAS wild-type*) erwiesen: anti-EGFR-Antikörper verlängern signifikant das Überleben und die progressionsfreie Zeit (12 Monate versus 7,5 ohne Antikörper)^{8,9}.

Nach alleiniger kurativer Karzinomresektion ohne anschließender medikamentöser Therapie liegt die Rezidivrate zwischen 18 (UICC-Stadium I) und 44 Prozent (UICC-Stadium III)¹⁰, nur circa 30 Prozent der Patienten mit R0-resezierten kolorektalen Lebermetastasen bleiben rezidivfrei^{1,11}. Daher ergeben sich die Leitlinienempfehlungen über eine adjuvante Chemotherapie. Jedoch wird eine partielle oder seltener komplette Remission kolorektaler Tumorpatienten im metastasierten Zustand (UICC-Stadium IV) nach erfolgter klassischer Chemotherapie in nur 50 bis 70 Prozent beobachtet¹², das 5-Jahres-Überleben liegt ohne Therapie bei 1 bis 2 Prozent und die mediane Überlebenszeit mit aktuellsten Therapiemöglichkeiten beträgt rund 30 Monate¹³. Die Hinzunahme molekularer Therapeutika zeigt einen belegbaren Erfolg im Sinne eines progressionsfreien Überleben oder, bei neoadjuvanter Anwendung, verbesserter R0-Resektionsrate¹. Hiermit ergibt sich ein vielversprechendes Potential an der weiteren Erforschung zielgerichteter antikörperbasierter Therapieansätze.

1.2. HER2 als Zielmolekül in der Krebstherapie

Seit dem Jahre 1998 in den USA und 2000 in Europa ist der humanisierte IgG1 monoklonale anti-HER2/neu Antikörper Trastuzumab (Handelsname Herceptin®) als erstes Molekül zur Behandlung von HER2/neu-hochexprimierenden Mammakarzinomen zugelassen^{14,15,16}. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der mit seiner spezifischen Sequenz an das extrazelluläre Epitop des HER2/neu-Rezeptors mit hoher Affinität und Spezifität bindet¹⁷. Mittlerweile sind weitere Therapeutika entwickelt worden, die in den HER2-Zellmechanismus eingreifen: Pertuzumab, die ligandenabhängige Heterodimerisierung von HER2 hemmend, ist zur neoadjuvanten oder im metastasierten Stadium indizierten Therapie des Mammakarzinoms zugelassen^{18,19}. Lapatinib, als Inhibitor der intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen sowohl des EGFR- als auch des HER2-Rezeptors, wird beim Trastuzumab-resistenten Mammakarzinom eingesetzt^{20,21}. Afatinib, zugelassen beim fortgeschrittenen oder metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, bindet an alle ErbB-Rezeptoren, unter anderem HER2 (siehe 1.3.1, Seite 5)²². Zuletzt wurde Trastuzumab Emtansin, (Abkürzung T-DM1) entwickelt, ein sogenanntes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat welches sowohl den Wirkmechanismus von Trastuzumab als auch von DM1 besitzt. DM1 unterliegt einer rezeptorvermittelten Internalisierung und hemmt die Neubildung des Zytoskletts durch Bindung an Mikrotubuli^{23,24,25} (siehe **Abbildung 2**, Seite 7).

Zudem wurde der Vorteil einer Kombination zweier etablierter Antikörper als Prinzip der dualen Hemmung erkannt: so führt die gleichzeitige Verabreichung von Trastuzumab und Pertuzumab zur Verlängerung des Gesamtüberleben bei Patientinnen mit HER2/neu-positivem metastasierten oder lokal rezidivierenden, inoperablen Brustkrebs^{18,26}. Des Weiteren zeigte die Kombination von Trastuzumab und Lapatinib, bei zunächst progredienter Krankheit unter Monotherapie, eine signifikant bessere Ansprechrate sowie Verlängerung des progressionsfreien Überleben²⁷.

Maßgeblich für die Verabreichung der Antikörpertherapie mit Trastuzumab sind entsprechend vorliegende histopathologische Untersuchungsbefunde des Tumors: beim Mammakarzinom ist einerseits die gleichmäßige intensive zirkuläre Zellmembranreaktion in mehr als 10% der invasiven Tumorzellen in der Immunhistochemie, kurz IHC (Score 3+) oder andererseits ein Nachweis einer HER2/neu-Genamplifikation durch ein positives Ergebnis in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, kurz FISH (HER2/CEP17-Quotient > 2.2) notwendig^{17,28} (**Tabelle 1**, Seite 4). Beide Testverfahren (IHC und FISH) sind beim Mammakarzinom gleichwertig prädiktiv²⁹ (**Abbildung 1**, Seite 4). Eine indizierte Therapie mit Trastuzumab ergab eine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit^{14,30,31,32}. Zudem wurde HER2/neu ein prognostischer und prädiktiver Marker beim Mammakarzinom^{32,33,34}.

Seit Oktober 2010 ist Trastuzumab auch für die Behandlung von HER2/neu-positivem metastasierten Magenkarzinom und Krebs des Speiseröhren-Magen-Übergangsbereiches zugelassen^{17,35}. Zur Indikationsstellung ist auch hier ein hoher HER2/neu-Nachweis nötig, allerdings erfolgt dieser anhand anderer Kriterien als beim Mammakarzinom: ein Score 3+ in >10% der Tumorzellen in der Immunhistochemie oder gleichzeitiger IHC Score 2+ und HER2/neu-Genamplifikation in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH+, HER2/CEP17-Quotient ≥ 2.0)^{17,36} (**Tabelle 1**, Seite 4). Ebenso anders als beim Mammakarzinom, ist die Immunhistochemie (IHC) prädiktiver als die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und stellt somit das erste Testverfahren. Erst bei einem IHC-Score 2+ wird eine zusätzliche FISH-Analyse notwendig (**Abbildung 1**, Seite 4). Die Addition von Trastuzumab zur Standardchemotherapie zeigte eine signifikante und klinisch relevante Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 2,7 Monaten bei an metastasiertem Magenkarzinom erkrankten Patienten³⁶. HER2/neu wird beim Magenkarzinom bereits als prognostischer Marker postuliert³⁷, jedoch wurde er noch nicht definitiv als solchen erwiesen^{38,39}.

Einleitung

Mammakarzinom	Magenkarzinom	HER2-Status
Immunhistochemie (IHC) - Scorekriterien		Score
Keine Färbung oder membranöse Färbung in $\leq 10\%$ der Tumorzellen	Keine Färbung oder membranöse Färbung in $< 10\%$ der Tumorzellen bzw. < 5 Zellen in Biopsien	0
Schwache membranöse Färbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	Schwache membranöse Färbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen bzw. ≥ 5 Zellen in Biopsien (bei 40-facher Vergrößerung*)	1+
Mäßige zirkuläre membranöse Färbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	Mäßige zirkuläre, basolaterale oder laterale membranöse Färbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen bzw. ≥ 5 Zellen in Biopsien (bei 20- bis 10-facher Vergrößerung*)	2+
Starke zirkuläre membranöse Färbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	Starke zirkuläre, basolaterale oder laterale membranöse Färbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen bzw. ≥ 5 Zellen in Biopsien (bei 5-facher Vergrößerung*)	3+
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)		Einteilung
HER2/CEP17-Quotient < 1.8 oder < 4 HER2/neu-Genkopien bei mindestens 20 auswertbare, sich nicht überlappende Zellen im invasiven Tumorabschnitt	HER2/CEP17-Quotient < 2.0 oder < 4 HER2/neu-Genkopien bei mindestens 20 auswertbare, sich nicht überlappende Zellen im invasiven Tumorabschnitt	negativ
HER2/CEP17-Quotient $1.8 - 2.2$ # oder ≥ 4 bis < 6 HER2/neu-Genkopien	$4 - 6$ HER2/neu-Genkopien #	fragwürdig #
HER2/CEP17-Quotient > 2.2 oder ≥ 6 HER2/neu-Genkopien bei mindestens 20 auswertbare, sich nicht überlappende Zellen im invasiven Tumorabschnitt	HER2/CEP17-Quotient ≥ 2.0 oder > 6 HER2/neu-Genkopien bei mindestens 20 auswertbare, sich nicht überlappende Zellen im invasiven Tumorabschnitt	positiv (Amplifikation)

Tabelle 1. Auswertkriterien der HER2/neu-Untersuchungen beim Mamma- und Magenkarzinom^{17,39,40}. *Die Einteilung des IHC-Scores beim Magenkarzinom wird durch die Objektivregel nach Rüschoff²⁹, 2011 vorgegeben. #Auszählen weiterer 20 bis 40 Zellen und Neuberechnen des HER2/CEP17-Quotienten^{29,41,42}.

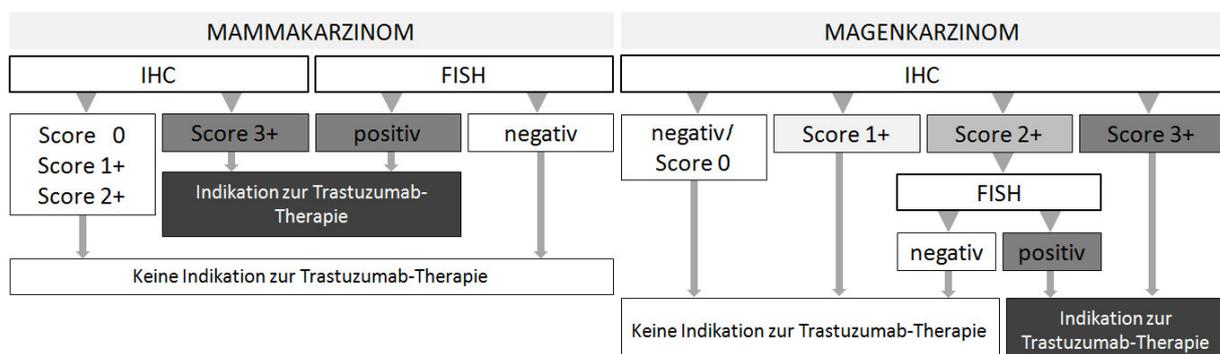


Abbildung 1. Flussdiagramme zur Indikationsstellung einer Trastuzumab-Therapie beim Mammakarzinom links und Magenkarzinom rechts. Beim Mammakarzinom sind beide Testverfahren gleichwertig prädiktiv²⁹, wohingegen beim Magenkarzinom die Immunhistochemie (IHC) gegenüber der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) vorrangig ist^{39,43}.

1.3. Die HER2/neu-Tumorbiologie

1.3.1. HER2/neu

Die Abkürzung HER (*human epidermal growth factor receptor*) bezeichnet einen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor, der als Transmembranprotein humaner Zellen in Form einer Tyrosinkinase für die Signaltransduktion zuständig ist. Es werden vier Varianten der sogenannten HER- oder ErbB-Familie zugeordnet: HER1 (ErbB1) auch unter EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) bekannt, HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4)⁴⁴. Sie ähneln sich in ihrem Aufbau, besitzen aber eine unterschiedliche Ligandenspezifität und -affinität. Für HER2 wurde bisher noch kein direkter Ligand gefunden^{44,45}, seine Funktion steht eher als Dimerisierungspartner für andere HER-Mitglieder, insbesondere HER3⁴⁶: nach Binden eines Liganden können die Tyrosinkinase-Rezeptoren miteinander dimerisieren (Heterodimerisierung) und somit das Signal über Autophosphorylierung und Rekrutierung von Signalmolekülen ins Zellinnere weiterleiten⁴⁴.

Allerdings kann es bei Überexpression von HER2 einerseits zur verstärkten Dimerisierung der Rezeptoren untereinander (Homodimerisierung) sowie andererseits zu einer Verstärkung der Signalweiterleitung durch HER-Rezeptoren kommen. Daraus resultieren vermehrter Zellwachstum und Inhibition des programmierten Zelltods, der Apoptose (siehe hierzu 1.3.2., Seite 6).

Eine solche Überexpression an HER2-Rezeptoren kann durch Amplifikation⁴⁷ oder Mutation der für HER2 kodierenden Genabschnitte (ErbB) resultieren. Dabei handelt es sich dann um ein Onkogen, das zuerst in Neuroglioblastomen von Ratten beschrieben wurde und daher das Akronym „neu“ trägt⁴⁸. Das HER2/neu-Onkogen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert⁴⁹ und kodiert für das 185kD große Transmembranprotein HER2^{33,50}. Darüber hinaus werden der HER2/neu-Genamplifikation weitere Tumoreigenschaften wie Zellmotilität, Invasivität, regionaler und metastatischer Progression sowie Angiogenese zugeschrieben^{51,52}.

Gleichzeitig bieten sich die anderen HER-Rezeptoren gleichfalls als Ziel einer spezifischen Therapie an, wie es ein neuer Ansatz mit HER3 versucht. Einerseits könnten die HER3-Liganden Neuregulin und Heregulin spezifisch durch Antikörper gebunden werden bevor sie ihrer Funktion als Wachstumsfaktor nachgehen, andererseits kann auch HER3 spezifisch gebunden werden bevor es mit einem anderen Rezeptor dimerisiert⁵³. Letzteres wird aktuell anhand anti-HER3-Antikörper in klinischen Studien unter anderem auch am kolorektalen

Karzinom untersucht: mit U3-1287 wurde bereits die erste Phase I-Studie mit ersten Erfolgen veröffentlicht⁵⁴, weitere Studien mit den Anti-HER3-Antikörper MM-121 und RG7116 sind in Gange⁵⁵.

1.3.2. Der HER-Pathway

Bindet ein Ligand an einem HER, dimerisiert dieser mit einem anderen HER, zum Beispiel einem HER2. Dabei kommt es zur Autophosphorylierung an der intrazellulären Seite der Rezeptortyrosinkinase. An den phosphorylierten Stellen docken nun Adapterproteine an, die eine Signalkaskade im Zellinneren auslösen. Drei Wege sind bislang bekannt: die RAS-MAP-Kinase-Kaskade, der PI3K/Akt-Weg sowie die Aktivierung der Phospholipase C (siehe **Abbildung 2**, Seite 7)⁵⁶. Zellwachstum oder Hemmung der Apoptose sind deren Folgen: Transkriptionsfaktoren im Zellkern werden aktiviert und fördern die Proliferation der Zelle oder pro-apoptotische Faktoren werden inaktiviert sowie anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 aktiviert. Bei erhöhter Rezeptordichte an der Zelloberfläche ist der Weg in ein übermäßiges und unkontrolliertes Zellwachstum gegeben. Des Weiteren zeigt eine HER2/neu-Überexpression eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit dem Ergebnis einer vollständigen Dysregulation des Transkriptoms im Zellkern⁵⁶.

Abbildung 2 zeigt die drei Signaltransduktionswege im Zellinneren, welche nach einer ligandenspezifischen Aktivierung von HER2, HER-Dimerisierung und Autophosphorylierung ausgelöst werden. Schematisch dargestellt sind die Ansatzpunkte der aktuellen anti-HER2/neu-Therapeutika (Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib) und dem Wirkstoff DM1.

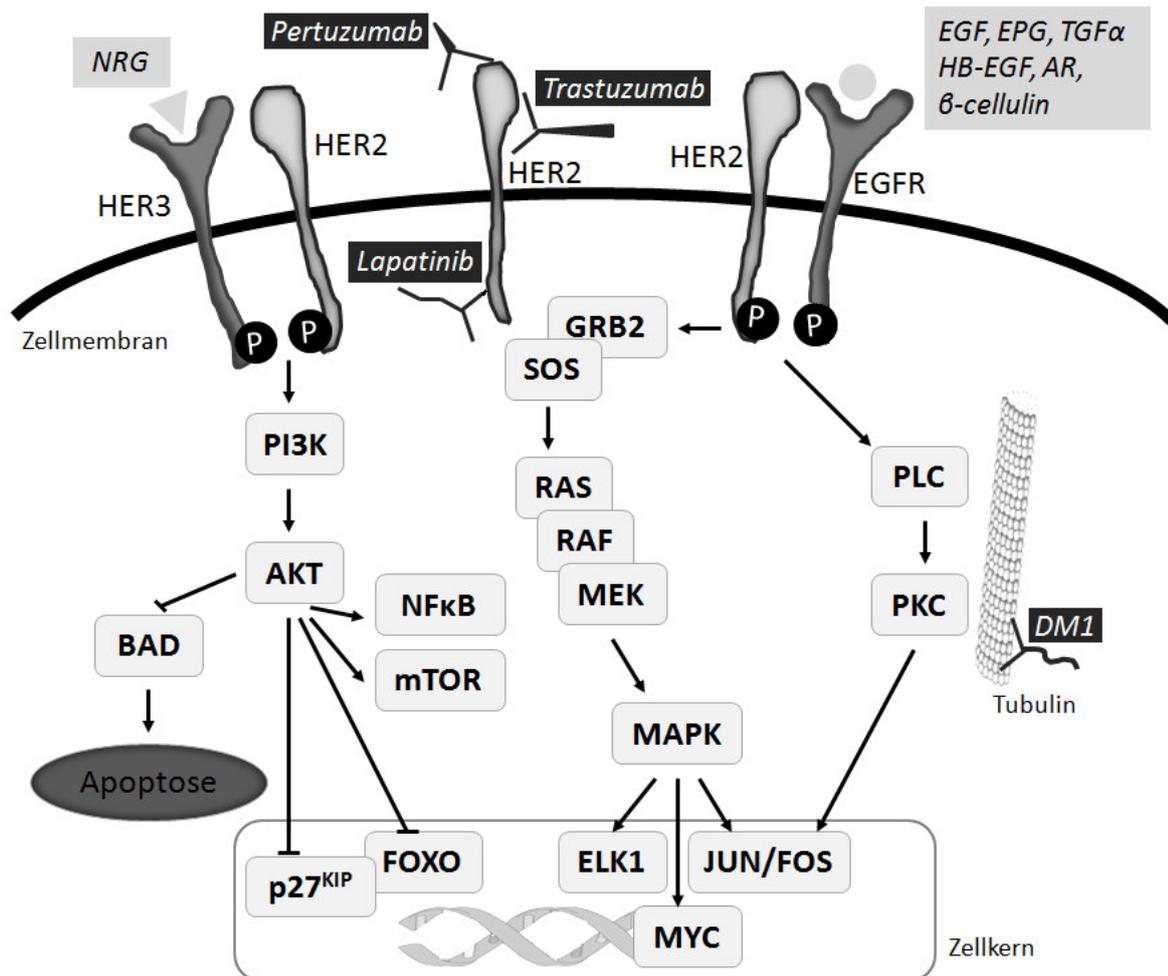


Abbildung 2. Der HER-Pathway modifiziert nach Emde et al.⁵⁶, 2010. Durch spezifische Ligandenbindung heterodimerisieren die Rezeptoren miteinander. Als Liganden für HER3 zählen Neureguline (NRG), für EGFR (auch HER1 benannt), epidermale Wachstumsfaktoren (EGF für *epidermal growth factors*) sowie Epiregulin (EPG), *transforming growth factor alpha* (TGF α), *heparin-binding epidermal growth factor-like factor* (HB-EGF), Amphiregulin (AR) und β -Cellulin (extrazellulär hellgrau markiert). Nach Autophosphorylierung (P) der intrazellulären Domäne der Rezeptoren werden Signaltransduktionswege ausgelöst. Zum einen besteht der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)-Signalweg, der eine weitere Kinase (AKT) aktiviert. Damit wird mit Inhibition des pro-apoptotischen Protein BAD der programmierte Zelltod verhindert, außerdem das zellwachstumfördernde mTOR (*mechanistic target of rapamycin*)-System aktiviert. Über AKT werden auch Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie sowie zellzyklusregulierende Proteine wie p27^{KIP} inhibiert. Des Weiteren gibt es den RAS-RAF-MEK-MAP-Signalweg, der im Zellinneren etliche Moleküle wie ELK1, JUN und FOS oder MYC reguliert, die für Transkription und Zellzyklus zuständig sind. Zudem ist über das Heterodimer EGFR/HER2 der Proteinkinase C-Weg (PKC) über die Phospholipase C (PLC) bekannt.

Dunkelgrau hinterlegt sind die anti-HER2-Therapeutika und ihre Ansatzpunkte: Trastuzumab und Pertuzumab binden HER2 extrazellulär und verhindern die Dimerisierung und somit die Signalweiterleitung in das Zellinnere. Lapatinib bindet an die intrazellulär gelegene Tyrosinkinase der Rezeptoren HER2 und EGFR und verhindert somit deren Phosphorylierung. DM1 bindet an das intrazelluläre Tubulin und verhindert die Neubildung des Zytoskeletts.

1.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Aus der bekannten und etablierten Therapiemöglichkeit des Mamma- und Magenkarzinoms mittels selektiver HER2/neu-Hemmung auf Tumorzellebene sowie vielversprechenden experimentellen Ergebnissen der Zellwachstumshemmung im Zellkulturmodell kolorektaler Zelllinien⁵⁷ und klinischen Therapieerfolgen⁵⁸, ergab sich die Frage nach dem HER2/neu-Expressionsprofil beim primären sowie hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom. Damit sollte eine Aussage über einen möglichen Einsatz einer anti-HER2/neu-Therapie mit beispielsweise Trastuzumab getroffen und HER2/neu als möglichen prädiktiven Biomarker bei diesem Tumortyp klassifiziert werden.

Wie oben einleitend dargestellt, unterscheidet sich die Bewertung bezüglich der HER2/neu-Expression zwischen den bekannten Tumorentitäten Mamma- und Magenkarzinom bereits vielseitig (siehe 1.2., Seite 2). Um so mehr stellte sich hiermit die dringende Frage nach der richtigen HER2/neu-Diagnostik mitsamt korrekter tumorspezifischen Auswertkriterien.

Die gängigen HER2/neu-Nachweismethoden Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), Paraffin- und Kryohistologie sowie verschiedene HER2/neu-Antikörper sollten methodisch verglichen werden. Dabei sollte herausgefunden werden, ob die Verfahren der anderen Gewebearten wie Brustdrüsengewebe und Magenschleimhaut auf die des Dickdarms und der Leber übertragen werden können. Das HER2/neu-Expressionsmuster im primären und hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom sowie im gesunden tumorfernen mukösen Referenzgewebe sollte ferner untereinander verglichen, möglichst genau auf ein bestimmtes Expressionsmuster untersucht und nach Richtlinien der HER2/neu-Diagnostik im Mamma- und Magenkarzinom ausgewertet werden.

Schließlich sollten die erhobenen HER2/neu-Ergebnisse fallbezogen mit den wichtigsten klinischen sowie pathologischen Parametern auf einen möglichen Zusammenhang untersucht und Korrelationen mit weiteren relevanten Biomarkern aufgedeckt werden, um somit eventuelle Patientensubgruppen zu ermitteln, die von einer anti-HER2/neu-Therapie profitieren würden. Eine Aussage über die prognostische Wertigkeit sollte bei nicht erhobenen Nachsorgedaten nicht erfolgen.

Ziel der Arbeit war es einerseits eine HER2/neu-Diagnostik beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom vergleichend mit den anderen Tumorentitäten Mamma- und Magenkarzinom zu definieren und andererseits das HER2/neu-Expressionsprofil im Malignom und dessen gutartiger Dickdarmschleimhaut zu beschreiben

Einleitung

sowie die tumorbiologische und klinische Wertigkeit von HER2/neu als möglichen prädiktiven Biomarker bei diesem Tumortyp zu erkennen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsgut und klinisch-pathologischen Daten

Alle untersuchten Gewebe stammen aus mehreren zertifizierten Darmzentren aus dem Großraum München sowie der Chirurgischen Klinik Großhadern und wurden in einem Zeitraum von November 2003 bis August 2011 gesammelt. Gewebestücke von Karzinomen oder Lebermetastasen wurden direkt aus dem entnommenen Tumorgebiet durch den diensthabenden Pathologen des jeweiligen Zentrums herausgeschnitten und auf Eis gelegt. Handelte es sich um ein Kolonresektat wurde ebenfalls tumorferne gesunde Kolonmukosa mitgegeben. Nach offizieller Aufarbeitung und Validierung durch den Pathologen, erfolgte die laborinterne nach Arbeitsanweisung standardisierte Gewebepräparation im Labor mit anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Die Ischämiezeiten lagen zwischen 15 und 45 Minuten. Die Tumorinvasionsfront der kolorektalen Karzinome war nur selten aufzufinden. Lebermetastasen hingegen wiesen immer die Grenze und damit Tumorinvasionsfront zum gesunden Lebergewebe auf. Alle Gewebearten wurden in der Gewebebank bei stetigen -80°C konserviert. Gleiche Aufbewahrungsverfahren werden in der Literatur beschrieben⁵⁹.

Eingeschlossen wurden Karzinome des gesamten Kolons sowie des oberen Rektumdrittels (über 12 bis 16 cm ab ano), 12 cm und weniger von der Linea anocutanea entfernt sitzende Rektumkarzinome wurden gemäß Leitlinien^{1,43} und Studien⁶⁰ ausgeschlossen. Als weitere Ausschlußkriterien galten Karzinome im Zusammenhang mit den vererbbaaren Darmerkrankungen HNPCC (Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom) und FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis), Zweitmalignome in der Anamnese sowie eine neoadjuvante Therapie. Bei den Lebermetastasen durften jedoch die kolorektalen Primärtumore zu einem früheren Zeitpunkt chemotherapiert werden.

Von vier Patienten konnte sowohl Primärtumor als auch autologe Lebermetastase untersucht werden. Ansonsten handelte es sich um metachrone Lebermetastasen, wovon die Daten des Primärtumors wenn möglich aus Krankenakten herausgesucht wurden.

Zu den Geweben entsprechend, wurden wichtige klinische Patientenparameter wie Geschlecht und Alter sowie tumorassoziierte Parameter erhoben, darunter die Tumorlokalisation und den gesamten pathologischen Tumorstatus (Tumorgröße,

histologischer Typ, TNM-Klassifikation² inklusive Differenzierungsgrad [Grading], Absetzungsrand [Residual] und UICC-Stadium²). Diese klinisch-pathologischen Daten sowie vorausgegangene Therapien konnten mittels Krankenakteneinsicht herausgesucht um mit den experimentellen Ergebnissen korreliert zu werden. Eine ausführliche Patientencharakterisierung stellt **Tabelle 7** dar (siehe Ergebnisteil, Abschnitt 3.1., Seite 25). Das Kollektiv widerspiegelt ein durchschnittliches, epidemiologisch korrektes und mit großen Studien^{61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71} vergleichbares Patientengut.

2.1.2. Antikörper

Zum Nachweis des HER2/neu-Antigens wurden drei verschiedene Antikörper benutzt: die intrazellulär membranständig-bindende Klone CB11 und 4B5 sowie N12 als extrazellulär membranständig-bindender Antikörper^{72,73,74}.

Der monoklonale anti-HER2/neu Hasen-Antikörper 4B5 ist der zu diagnostischen Zwecken von der *European Medicines Agency* (EMA) und der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) offiziell zugelassene Antikörper und findet Verwendung im HER2/neu-Diagnostikverfahren HercepTestTM (Dako, Dänemark) zur Indikationsstellung einer möglichen Trastuzumab-Therapie beim Mamma- und Magenkarzinom⁷⁵.

Zudem benutzt ein von Roche® verwendetes HER2/neu-Diagnostikpaket PATHWAY® (Ventana, USA) ebenfalls den Klon 4B5. Der Antikörper CB11 wird im Bond OracleTM Immunhistochemie-System (Leica, Deutschland) verwendet. Beide Letztere sind bislang nur von der amerikanischen Behörde (FDA) anerkannt.

Als Nachweis und zur Orientierung von epithelialen Zellen auf dem Gewebeschnitt diente der anti-humane Zytokeratin-Breitspektrum-Antikörper KL1 (Zytokeratine 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 18). Als spezifischer und zuverlässiger Marker wurde er als Positivkontrolle eingesetzt. Neben KL1, diente EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) als Oberflächenmolekül zur Zelltypisierung sowie als Referenzmarker für kurze Ischämiezeiten und guter Präparatqualität.

Des Weiteren wurde der Antikörper Ki67 als Proliferationsmarker⁷⁶ eingesetzt. Proliferationsaktivität sowie bevorzugte Zonen konnten hiermit identifiziert und genauer beobachtet werden.

Als Nachweis von Infiltration diente der Panleukozytenmarker CD45. Lymphoide Zellen werden hiermit membranständig markiert. In diesem Zusammenhang wurde auch das

Material und Methoden

Expressionsprofil von HLA-DR (*human leukocyte antigen - D related*), einem MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse II Zelloberflächenrezeptor, auf Epithelzellen untersucht, der im Falle einer Immunantwort hochreguliert wird und somit als Aktivierungsmarker genutzt wurde: der Antikörperklon DK22 bindet spezifisch an die alpha-Kette des HLA-DR.

Der *Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor* (EGFR, oder auch als HER1 bekannt) ist wie HER2/neu Mitglied der ErbB-Unterfamilie von Rezeptor-Tyrosinkinasen (siehe 1.3.1., Seite 5), der in malignen Zellen hochreguliert wird und dadurch unkontrolliertes Wachstum fördert.

Tabelle 2 stellt alle benutzten Antikörper mit Verwendungs- und Herstellerangaben dar.

Antigen	Antikörper	Isotyp	Stamm-konz. mg/ml	Arbeits-konz. µg/ml	Verd.	Hersteller	Bestellnummer
Zytokeratin	KL1	IgG1	0,127	0,32	1:400	Beckmann Coulter	IM1918
Ki67	MIB-1	IgG1	0,08	1,14	1:70	Dako	M7240
CD45	2B11/PD7	IgG1	0,35	4,5	1:100	Dako	M0701
HLA-DR	DK22	IgG2a	0,2	0,667	1:300	Dako	M0704
EpCAM	BerEp4	IgG1	0,25	2,5	1:100	Dako	M0804
HER2/neu	CB11	IgG1	0,026	0,26 / 1,5	1:100 / 1:17,3	Novo Castra	NCL-CB11
	N12	IgG1	0,2	0,25	1:800	NeoMarkers	MS-301-P
	4B5	Monoklonal, Hase	0,006	1,5	1:4	Ventana	790-2991
EGFR	H11	IgG1	0,587	2,94	1:200	Dako	M3563

Tabelle 2. Zelltypische und HER2/neu-spezifische Antikörper. Stammkonz. bezeichnet die Konzentration in dem der Antikörper vom Hersteller geliefert wird. Arbeitskonz. bezeichnet die Konzentration in der der Antikörper auf das Gewebe aufgetragen wurde. Verd. ist die daraus resultierende Verdünnung.

Tabelle 3 zeigt die Antikörper und Seren der Negativkontrollen. Sie dienen bei der Auswertung zum Erkennen und Einschätzen unspezifischer Hintergrundfärbung (siehe 2.2.5., Seite 19). Hierzu zählt MOPC-21, ein monoklonales Immunglobulin der Maus mit unbekannter Spezifität und verbreitet als IgG1-Isotypkontrolle. Zudem diente UPC-10, ein nicht reaktives Immunglobulin der Maus, als IgG2a-Isotypkontrolle. Negativkontrollen des 4B5-Antikörpers, wurden mit Hasenserum in entsprechend höchstapplizierter Antikörperkonzentration (1,5 µg/ml) inkubiert.

Material und Methoden

Antikörper und Seren	Isotyp	Stamm-konz. mg/ml	Arbeits-konz. µg/ml	Verd.	Hersteller	Bestellnummer
MOPC-21	IgG1	1	4,5	1:222	Sigma Aldrich	M9269
UPC-10	IgG2a	1	0,667	1:1500	Sigma Aldrich	M9144
Hasenserum		15*	1,5	1:10000	Dako	X0936

Tabelle 3. Übersicht der Negativkontrollantikörper und Seren. Stammkonz. bezeichnet die Konzentration in dem der Antikörper/das Serum vom Hersteller geliefert wird, * Protein-konzentration des Serums. Arbeitskonz. bezeichnet die Konzentration in der der Antikörper/das Serum auf das Gewebe aufgetragen wurde. Verd. ist die daraus resultierende Verdünnung.

2.1.3. Zelllinien

Zur Validitätskontrolle der Färbedurchläufe wurden Präparate benötigt, die sicher ein positives Ergebnis aufweisen. Hierfür wurden eigens dafür produzierte Zytospin-Objektträger mit Zelllinien angefertigt, die für den jeweiligen Antikörper sicher positiv zu erwarten waren. Ein Fehler im Färbeablauf würde auch die Positivkontrollen betreffen und somit auffallen. Welcher Zelltyp für welchen Antikörper benutzt wurde und welche Färbereigenschaften dieser aufweist, widerspiegelt **Tabelle 4**. **Tabelle 5** charakterisiert die einzelnen verwendeten Zelllinien.

Antigen	Anti-körper	verwendete Zelllinien als Positivkontrolle					
		Typ	%Anteil positiver Zellen	Expressionsprofil			Färbeintensität (±, +, ++)
				Membran-ständig	Zytoplasma-tisch	Nukleär	
Zytokeratin	KL1	HT29	100		•		++
Ki67	MIB-1	HT29	40			•	+ / ++
HLA-DR	DK22	HL60	50	•			+
EpCAM	BerEP4	HT29	100	•			+ / ++
HER2/neu	CB11	N87	100	•			+
	N12	N87	100	•			± / +
	4B5	N87	100	•			+
EGFR	H11	HT29	100	•	•		± / +

Tabelle 4. Zelllinien für Zytospinpräparate als Positivkontrolle der Antikörper. %-Anteil positiver Zellen im Zytospinpräparat. Färbeintensität in ± (schwach), + (mäßige) und ++ (stark) quantifiziert.

Material und Methoden

Zelllinie	Tumorentität	Zelltyp	ATCC®-Nummer
HT29	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	HTB-38
N87	Lebermetastase aus Magenkarzinom	Epithelial	CRL-5822
HL60	Promyelozytenleukämie	Blutzelle	59171

Tabelle 5. Zellliniencharakterisierung.

2.1.4. Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 6 beinhaltet in alphabetischer Reihenfolge alle benötigten Reagenzien, Lösungen und Chemikalien für die Immunhistochemie mit Angabe des Herstellers. Die Antikörper werden gesondert in Abschnitt 2.1.2. (Seite 12) und **Tabelle 2** und **3** (Seiten 13 und 14) vorgestellt. Die genaue Zusammensetzung sowie Herstellung von Lösungen für den Färbeprozess werden in Abschnitt 2.1.5. (siehe unten) beschrieben.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	Roth	7328.1
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories	SP-2001
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma Aldrich	A5754-10G
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	6580.0500
Essigsäure	Merck	1.0006.1000
Kaiser's Glyceringelatine	Merck	1.09242.0100
Kaliumchlorid	Fluka	60130
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	4873.1000
Natriumacetat	Fluka	08625
Natriumchlorid	Fluka	71380
N,N-Dimethylformamide	Fluka	40250
Mayer's Hämalun	Merk	1.09249.0500
35%iges Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth	9683.4

Tabelle 6. Reagenzien und Chemikalien mit Herstellerangabe und Bestellnummer.

2.1.5. Lösungen und Antikörpersubstanzen

Als Grundlösung für Waschstschritte sowie Herstellen des Suspensionsmediums für Antikörper, wurde die physiologische und isotonische phosphatgepufferte Salzlösung (kurz PBS, aus dem englischen *phosphate buffered saline*) verwendet. Diese setzt sich aus folgenden Chemikalien zusammen:

8,0 g Natriumchlorid (NaCl)

0,2 g Kaliumchlorid (KCl)

1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄).

Diese Salze werden in einem Liter destilliertem Wasser aufgelöst. Nach jedem Herstellungsvorgang erfolgte die pH-Kontrolle, bei der der pH-Wert bei 7,4 liegen sollte. Seltene Abweichungen wurden entsprechend mit Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) korrigiert.

10%-AB-Serum-PBS wurde als Verdünnungsmedium zur Antikörpertitrationen genutzt. AB-Serum (Art.-Nr. 805 135, Biotest Medical Diagnostics) ist ein antikörperfreies, humanes Serum der Blutgruppe AB und ist damit ein gut geeignetes physiologisches Suspensionsmedium. 10%-AB-Serum-PBS wird aus 1 ml AB-Serum in 9 ml PBS hergestellt.

Die Antikörpersubstanzen wurden in der jeweiligen optimalen und zuvor etablierten Konzentration (siehe dazu **Tabelle 2** und Abschnitt 2.1.2., Seite 12) frisch für jeden Färbvorgang mit 10%-AB-Serum-PBS angesetzt (siehe oben).

Zur Herstellung der entscheidenden AEC-Peroxidase-Färbelösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol), wird die 100xNatriumacetat-Stammlösung benötigt. Dazu werden 28,7 g Natriumacetat in 50 ml destilliertem Wasser langsam unter Rühren gelöst, unter dem Abzug werden 9,4 ml Essigsäure hinzugefügt. Die Lösung wird auf 100 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und deren pH kontrolliert. Optimal ist ein pH-Wert von 4,9, der gegebenenfalls mit Essigsäure eingestellt werden kann.

Im Folgenden wird die Herstellung der AEC-Peroxidase-Färbelösung beschrieben:

- a. 2 ml 100xNatriumacetat-Stammlösung in 200 ml destilliertes Wasser geben
- b. genau abgewogene 50 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 5 ml N,N-Dimethylformamide lösen
- c. Produkt aus **b.** in Produkt aus **a.** geben und 100 µl 35%iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dazugeben.

Die Angaben ergeben etwa 200 ml Lösung, genug für eine Standard-Färbekuvette. Die Lösung sollte stets frisch angesetzt und für jede Färbung individuell hergestellt werden. Dabei muss auf eine vorsichtige Handhabung und Arbeiten unter Luftabzug geachtet werden, da AEC kanzerogen ist. Die Lösung ist lichtempfindlich.

2.2. Methoden

2.2.1. Einfrieren von Gewebe

Das Einfrieren von Gewebeproben erfolgte nach standardisiertem laboreigenem Verfahren. Nach Wiegen, Freipräparieren und Teilen der Gewebestücke (Mukosa in circa 2 cm lange Stücke, Tumore und Metastasen in circa 0,5 bis 1 cm Blöcke) wurden diese schonhaft zunächst im Stickstoffdampf und anschließend in flüssigem Stickstoff gehalten und schockgefroren. Die Konservierung erfolgte anschließend portionsweise in beschrifteter Aluminiumfolie im Gefrierschrank bei stetigen -80°C .

2.2.2. Anfertigen von Gefrierschnitten

Für die Kryomunhistochemie, wie sie in Abschnitt 2.2.4. (Seite 18) ausführlich erläutert wird, wurden Gewebeschnitte auf Objektträgern angefertigt. Dazu kam das Gefriermikrotom der Firma Leica (Jung Frigocut 2800E) zum Einsatz. Anders als bei der Paraffinhistologie, bei der das Gewebe zuerst aufwendig in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten wird, werden Gefrierschnitte ohne den aggressiven und gewebeschädigenden Konservierungsprozess gefertigt. Bei einer konstanten Temperatur von -20°C im Microtom (Leica), wird das zu untersuchende Gewebe, in weiterhin gefrorenem Zustand, zunächst korrekt nach spezifischem Tumorareal auf einem Korkplättchen mittels Einbettmedium (Tissue-Tek[®] Compound, Art.-Nr. 4583) fixiert und anschließend in regelmäßigen Schnittbewegungen in $5\ \mu\text{m}$ dünne Scheiben geschnitten. Das hauchdünne Gewebeblatt wird anschließend Dank der Adhäsionskraft, die zusätzlich durch die positiv geladenen Objektträger (Poly-Prep Slides[®], Sigma-Aldrich) besteht, auf das Glas gebracht. Hierbei ist penibel auf etwaige Furchen- oder Faltenbildung zu achten, die es zu verhindern gilt. Diese verursachen bei der Färbung die häufigsten Artefakte und können zu Fehlinterpretation und falschen Auswertungen führen. Wichtig ist zudem eine serienmäßige Produktion der Objektträger ohne größeren Zwischenabfall herzustellen, um im Nachhinein möglichst benachbarte Gewebeschnitte zu bekommen und somit wiedererkennbare und vergleichbare Areale aus dem Gewebeblock, hier Tumor oder Metastase, zu haben.

Anschließend erfolgte das Trocknen der Objektträger in staubfreiem Umfeld bei Raumtemperatur und über Nacht. Jeder Objektträger wurde mit der Gewebenummer, Seriennummer sowie das Schneidedatum versehen.

2.2.3. Anfertigen von Zytospinpräparaten

Zur Validitätskontrolle der Färbeabläufe liefen parallel zum jedem Färbeprozess Zytospinpräparate mit geeigneten Zelltypen mit (siehe 2.1.3., Seite 14). Ausgesuchte, das spezifische Antigen sicher exprimierende Zellen (**Tabelle 4**, Seite 14) wurden von laboreigenen technischen Mitarbeitern in Kultur genommen und zur Verfügung gestellt. Bei adäquaten Bedingungen wurden sie zur Herstellung von Zytospins genutzt. Dabei war auf eine hohe Zellvitalität und angemessene Zelldichte zu achten, um aussagekräftige Positivkontrollen zu erzeugen: sich in Medium befindende Zellen wurden zunächst ausgezählt und anschließend entsprechend im Medium verdünnt um eine adäquate Zellzahl auf dem Zytospin zu bekommen. Damit wurden mit einer Zytospin-Zentrifuge der Firma Shandon (Cytospin 2) gemäß Herstellungsverfahren Zellspots auf Objektträger angefertigt, die ebenfalls in staubfreiem Umfeld bei Raumtemperatur und über Nacht getrocknet wurden. Die Konservierung der Präparate erfolgte anschließend in der Gewebebank bei konstanten -80°C .

2.2.4. Kryoimmunhistochemie

Bei der durchgeführten Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um die *Labelled Streptavidin-Biotin*-Methode, kurz LSAB. Dabei wird ein Antikörpergerüst basierend auf dem zu erforschenden Antigen nach und nach aufgebaut, dessen Endzweig letztendlich in einer Farbreaktion (Peroxidasereaktion) sichtbar gemacht wird (**Abbildung 3**, Seite 19). Daraus resultiert ein komplexer und langer Färbeablauf.

Die bereits am Vortag vorgefertigten und beschrifteten Gefrierschnitte sowie die aufgetauten Zytospinpräparate (Abschnitt 2.2.2. und 2.2.3., siehe oben) wurden zu Beginn, zur Gewebe- und Zellfixierung auf den Objektträgern, für 8 Minuten in reines Aceton gebadet und für weitere 8 Minuten staubfrei bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 10-prozentigen AB-Serum-PBS-Lösung rehydriert und somit gleichzeitig die endogene Gewebeperoxidase blockiert, damit diese bei der späteren Peroxidasereaktion keine unspezifische Färbung hervorruft.

Endogenes Biotin wurde in zwei weiteren 15-minütigen Inkubationsschritten mittels dem Avidin-Biotin-Blocking-Kit (Vector Laboratories) gebunden.

Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von dem spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper für weitere 30 Minuten. Schließlich wurde das *Horseradish-peroxidase-Streptavidin* (HRP-Streptavidin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen.

Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger vorsichtig in PBS-Lösung dreimalig für insgesamt etwa 10 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion mittels Baden der Präparate in der AEC-Peroxidase-Lösung (siehe 2.1.5., Seite 15) für 8 Minuten bei Raumtemperatur, in Dunkelheit und auf dem Schüttler sichtbar.

Schließlich wurden die Präparate mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und in fließendem Wasserbad für mindestens 20 Minuten gebläut.

Zuletzt wurden die Objektträger nach Antrocknen mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckt und versiegelt.

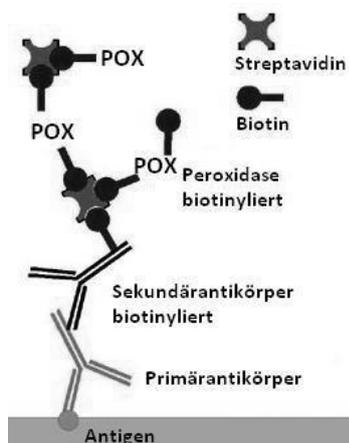


Abbildung 3. Avidin-Biotin-Komplex (ABC)⁷⁷ nach der *Labelled Streptavidin-Biotin-Methode* (LSAB). POX bedeutet Peroxidase.

2.2.5. Auswertung

Es erfolgte die semiquantitative Auswertung der gefärbten Präparate unter dem Lichtmikroskop der Firma Olympus (Faserkontrastmikroskop BX40) innerhalb der zwei folgenden Tage nach Färbung.

Als spezifische Färbung wurde die klare, eindeutige, gut abgrenzbare und zuordenbare Färbung der untersuchten Zellen beziehungsweise derer Zellkompartimente durch den applizierten Antikörper definiert. Als unspezifische Färbung wurde die für den Antikörper nicht spezifische Reaktion auf Zellen oder Zellkompartimente (zum Beispiel „granuläre“ zytoplasmatische Färbung) bezeichnet. Mit Hintergrundfärbung wurde eine fälschlicherweise entstandene nicht antikörperspezifische generalisierte und zellunspezifische teilweise

verschleiende Färbung des gesamten Präparates oder Objektträger beschrieben: diese wurde mit Hilfe der Negativkontrollen erfaßt und bei der Auswertung vom Ergebnis abgezogen (siehe unten).

Zunächst wurden systematisch die Positivkontrollen ausgewertet und die Validität des Färbeprozesses für jeden Antikörper geprüft. Dabei wurde die spezifische zu erwartende Anfärbung in Prozent aller Zellen sowie die Färbeintensität überprüft (siehe 2.1.3., **Tabelle 4**, Seite 14). Areale mit Färbeartefakten wurden ausgeblendet. Bei fehlendem oder unspezifischem Ergebnis wurde der Färbungsprozess in Frage gestellt und die Ergebnisse für den jeweiligen Antikörper verworfen und die Färbung wiederholt. Als Positivkontrolle für den Leukozytenmarker CD45 dienten immer vorhandene Leukozyteninfiltrate und Lymphfollikel im Gewebe.

Anschließend wurden die Gewebeproben der Negativkontrollen untersucht und somit eine unspezifische Färbung ermittelt (siehe 2.1.2. und **Tabelle 3**, Seite 13). Sollte es dabei zu einer leichten Reaktion gekommen sein, erfolgte die tatsächliche Auswertung des Antikörpers stets im Vergleich und unter Abzug dieser unspezifischen Färbung (siehe oben).

Die Auswertung der Antigenfärbung erfolgte anschließend semiquantitativ: zunächst wurden im dargestellten Gewebeareal, die spezifisch angefärbten Mukosa-, Tumor- oder Metastasenzellen auf dem Präparat in Prozent geschätzt, gefolgt von der Färbeintensität nach dem Schema leicht (1 oder \pm), mäßig (2 oder +) oder stark (3 oder ++). Heterogenität im Gewebe wurde gesondert dokumentiert und die stärkste aufgetretene Färbeintensität als geltend ausgewählt. Als Referenz welche Areale tatsächlich Epithel bzw. Tumorepithel darstellen, diente während der gesamten Auswertungsphase jeweils der Zytokeratin-Nachweis (KL1) auf gesondertem Objektträger. Die Auswertung erfolgte immer in Zusammenschau mit der Negativ- und Positivkontrolle.

Die Zellproliferation wurde mit dem Ki67-Labeling-Index⁷⁶ (Ki67-LI) quantifiziert. Dieser stellt den Anteil an Ki67 positiv gefärbten Tumorzellen in einem ausgewählten Areal des Präparates mit hoher Zellfärberate (sogenannte Hot-Spot-Region) dar. Hierzu wird das Verhältnis von gefärbten zu negativen Zellen in drei verschiedene Blickfelder von 250 x 250 μm bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert in Prozent wiedergegeben. Bei der Mukosaauswertung wurde das Blickfeld auf eine komplette Krypte angepasst und betrug somit etwa die Maße 300 x 400 μm .

Ergänzend wurde neben den Epithelzellen auch auf weitere Zelltypen geachtet und diese mitausgewertet. So wurde das Färbeverhalten von Leukozyten und deren Lokalisation im Gewebe oder Tumor, Fibroblasten im Bindegewebe sowie Muskelzellen der Muscularis mucosae erfasst. Selten war auch eine Aussage von Endothelzellen aus Gefäßanschnitten möglich. Die Färbeseigenschaft von Muzin, zum Beispiel in den Mukosakrypten oder Schleimseen bei muzinösen Adenokarzinomen, wurde ebenfalls dokumentiert, sowie Nekroseareale selbst mit ihrer Umgebung wenn diese vorhanden waren.

Außerdem wurde besonders auf die Tumorinvasionsfront (eventuell vorhandene gesunde tumornahe Mukosa sowie metastasenangrenzende Leberzellen) geachtet.

Bei der Auswertung der gesunden tumorfernen Mukosa wurde zusätzlich die Lokalisation der positiven Epithelzellen in der Krypte dokumentiert. Hierfür wurde die Krypte in fünf Kompartimente unterteilt⁷⁸ und drei Bereiche wie folgt definiert: Oberfläche (luminales oberes Fünftel), Hals (mittlere drei Fünftel) und Basis (unteres Fünftel).

Alle Ergebnisse wurden standardisiert für alle Antikörper gleichermaßen mit Ausnahme der HER2/neu-Präparate auf einem eigens entwickelten Auswertbogen festgehalten. Die gesonderte Auswertung der HER2/neu-Färbung wird in Abschnitt 2.2.6. (siehe unten) erläutert.

2.2.6. Auswertung der HER2/neu-Präparate

Die Auswertung der HER2/neu-Präparate unterschied sich in zwei Punkten wesentlich von den anderen untersuchten Antigenen. Dabei wurde die bereits standardisierte und etablierte Auswertung von HER2/neu im Magenkarzinom^{40,79} mit Ausnahme des nicht berücksichtigten Stichwertes (sogenannten Cut-off) von 10% positiver Zellen, übernommen (siehe Einleitung: Abschnitt 1.2., **Tabelle 1**, Seiten 2 und 4).

Einerseits wurde besonders auf die Spezifität der HER2/neu-Färbung geachtet, denn nur eine komplette, basolaterale oder laterale membranöse Färbung der Epithelzellen wurde als positiv gewertet. Eine isoliert luminale oder basale membranöse Färbung sowie weitere angefärbte Zellkompartimente wie Zytoplasma und Zellkern galten als unspezifisch positiv und wurden nicht berücksichtigt (**Abbildung 4**, Seite 22).

Andererseits erfolgte die HER2/neu-Auswertung nach einem gesonderten Scoring nach dem Magenkarzinomschema⁷⁹. Neben der semiquantitativen Schätzung vom Anteil spezifisch positiver Epithelzellen wurde die Intensität nach der Objektivregel nach Rüschoff et al.⁴²,

2010 erhoben. Diese Regel versucht die Färbeintensität (genannt Scoring) zu objektivieren, vereinheitlichen und dadurch untersucherunabhängig und reproduzierbar zu machen. Es werden die Scores 0 (negativ), 1+ (schwach positiv), 2+ (positiv) und 3+ (stark positiv) unterschieden. Dabei wird der Score 3+ bei einer Färbung bereits in der geringsten Vergrößerung (5x) oder bereits mit dem bloßem Auge sichtbar vergeben, der Score 2+ bei einer benötigten 10-facher bis 20-facher Objektivvergrößerung und der Score 1+ nur bei Nachweis mit dem 40x-Objektiv (**Abbildungen 4 und 5**, siehe unten). Score 0 erhält das Gewebe bei komplett negativer oder unspezifischer Epithelfärbung. Auch hier wurde Heterogenität im Gewebe gesondert dokumentiert und die stärkste Färbeintensität als geltend ausgewählt.

Wie eingangs erwähnt, wurde, anders als beim Mamma- und Magenkarzinom (10%-Cut-off⁴²), kein Stichwert (Cut-off) positiver Zellen für eine HER2/neu-Positivität festgelegt, sondern das Gewebe ab bereits einer spezifisch positiven epithelialen Zelle gemäß Auswertungskriterien als positiv gewertet.

Das Färbeverhalten von Muzin und das bereits bekannte körnige Färbemuster „granulär“ wurden ebenfalls festgehalten. Auch die Tumorinvasionsfront sowie Nekrose-angrenzende Areale im Tumor (sofern vorhanden) wurden ausgewertet.

Bei der Auswertung der gesunden tumorfernen Mukosa wurde ebenfalls Wert auf die Kryptenlokalisierung der positiven Epithelzellen gelegt. Hierbei wurde die Krypte etwas genauer in 5 Abschnitte unterteilt⁷⁸, von 1 – luminal bis 5 – basal (siehe 2.2.5., Seite 19).

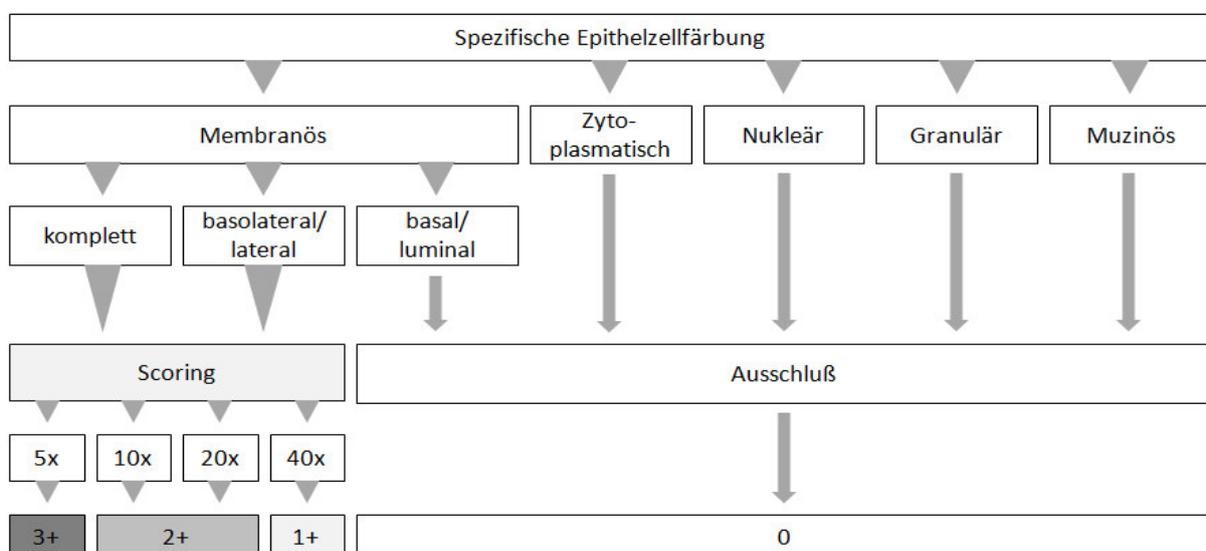


Abbildung 4. Flußdiagramm zur gesonderten HER2/neu-Auswertung modifiziert nach Rüschoff et al.⁴², 2010. Für das Scoring (**3+**, **2+**, **1+**) war die Vergrößerung des Objektivs (**5x**, **10x**, **20x**, **40x**) maßgeblich (Objektivregel). Bei Ausschluß wurde der Score 0 (**0**) vergeben.

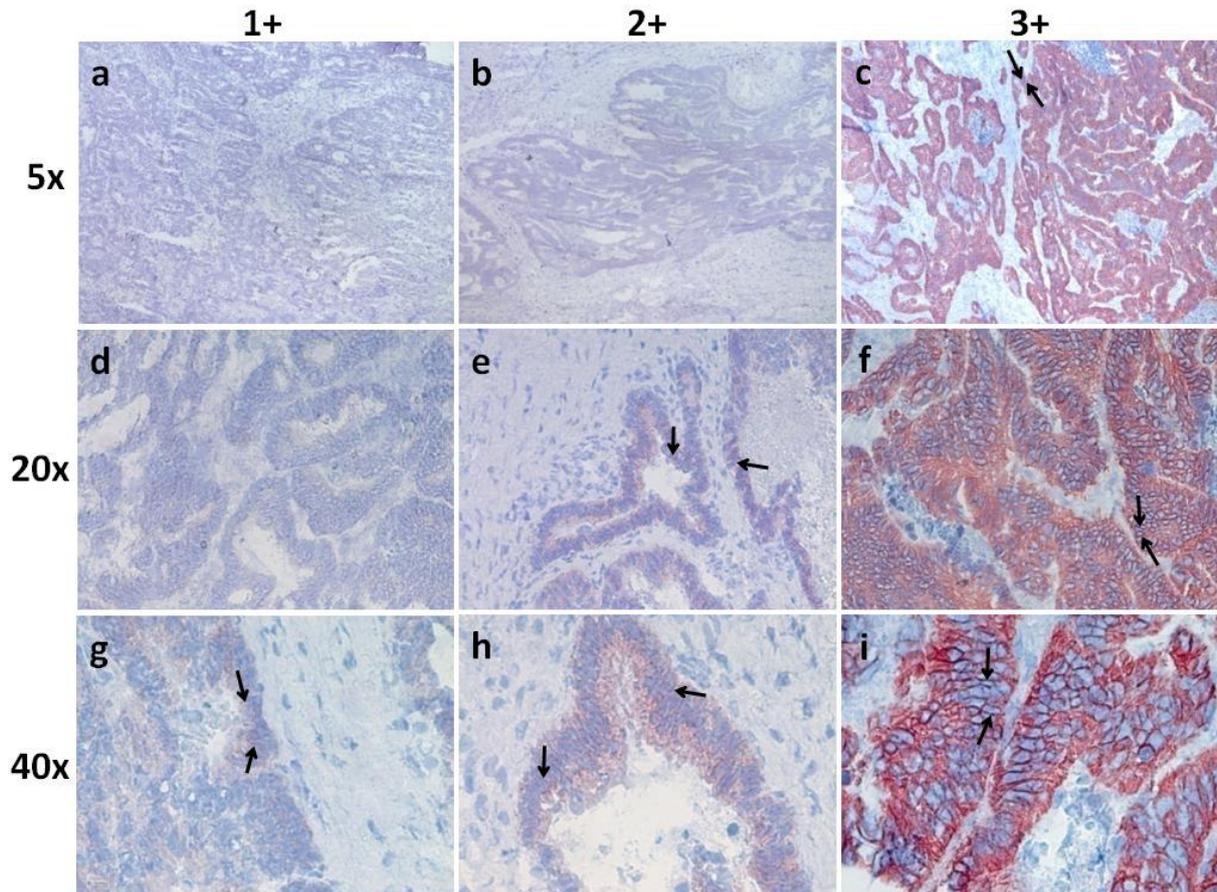


Abbildung 5. Repräsentative Gewebeschnitte von kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen angefärbt mit dem HER2/neu-Antikörperklon 4B5 in allen drei Scores in 5-facher (a-c), 20-facher (d-f) und 40-facher Vergrößerung (g-i). Die Pfeile deuten auf spezifische membranöse Färbung.

2.3. Statistik

Zum Vergleich der verwendeten HER2/neu-Antikörper CB11 und 4B5 sowie der Ergebnisse beider immunhistochemischen Verfahren Kryo- und Paraffinhistologie wurde der Bland-Altman Plot⁸⁰ verwendet. Dabei werden nur etwaige Differenzen zwischen den zwei Ergebnissen auf einer Grafik aufgetragen und somit ersichtlich. Als Hilfe zur Einschätzung der Unterschiede ist die Standardabweichung in der Grafik integriert. Somit sind Ausreißer schnell zu erkennen.

Die Ergebnisse beider Färbeverfahren wurden mit dem Spearman-Rank Korrelationskoeffizienten (r) verglichen: in einer Spanne von -1 bis 1, zeigt ein Wert von 0 keine Korrelation zwischen den Daten, 1 entspricht einer völligen Übereinstimmung und -1 eine komplette negative Korrelation.

Die Korrelationen von Färbeergebnissen untereinander sowie mit den klinischen und pathologischen Daten wurden mittels zweiseitigen Student-t-Test oder Vier-Felder-Tafeln

mit dem exakten zweiseitigen Fisher-t-Test berechnet. Für die HER2/neu-Expression wurde einerseits das Paar „negativ“ versus „positiv“ (kein Cut-off) sowie die Gegenüberstellung „Score 0, 1+, 2+“ versus dem therapierelevanten Trastuzumab-indizierenden „Score 3+“ gebildet. Die Gruppierung der durch Krankenakteneinsicht erhobenen Patientendaten erfolgte anhand gängiger Einteilungen nach Durchschnitt (oberhalb/unterhalb), Grade (fortgeschritten/nicht fortgeschritten), klinischer meist prognostischer Wertigkeit oder Vorhandensein eines Merkmales (ja/nein).

Als statistisch signifikant wurden p-Werte unter 0,05 gewertet ($p < 0,05$). Benutzt wurde hierfür das Statistikprogramm IBM® SPSS Statistics 21.0.

2.4. Weitere Untersuchungsverfahren

2.4.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die mittels Immunhistochemie erhobene HER2/neu-Expression auf den Gewebeproben wurde stichprobenartig mit dem weiteren etablierten HER2/neu-Diagnostikverfahren der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erhoben. Dabei kann eine mögliche HER2/neu-Genamplifikation nachgewiesen werden⁸¹. Dieses Verfahren wird zusätzlich zur Immunhistochemie zu diagnostischen Zwecken und Indikationsstellung einer möglichen Trastuzumabtherapie eingesetzt^{39,40} (siehe Einleitung: Abschnitt 1.2., **Tabelle 1**, Seite 4).

Die Ausführung dieser Methode an stichprobenartig ausgewählten Geweben aus dem Kollektiv wurde dankenswerter Weise im Rahmen einer Kooperation nach standardisiertem Verfahren und gemäß geltenden Kriterien durch das pathologische Institut Innenstadt der Universität München übernommen.

2.4.2. Paraffinimmunhistochemie

Des Weiteren wurden die mittels Kryoimmunhistochemie und dem Klon 4B5 erhobenen HER2/neu-Ergebnisse mit denen aus der in der Pathologie standardmäßig eingesetzten Paraffinimmunhistochemie verglichen. Auch letztere Methode wurde nach standardisiertem Verfahren und gemäß geltenden Kriterien dankenswerter Weise durch die Pathologie Innenstadt der Universität München stichprobenartig an einigen Proben des Kollektiv angewandt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientencharakterisierung

Untersucht wurden 89 primäre kolorektale Karzinome mit autologer gutartiger tumorfernen Kolonmukosa sowie 59 kolorektale Lebermetastasen. **Tabelle 7** stellt eine ausführliche Patientencharakterisierung dar.

Patientenassoziierte Parameter	n	Kolorektale Karzinome	n	Lebermetastasen
Geschlecht	89		59	
Männlich		50 (56,2%)		37 (62,7%)
Weiblich		39 (43,8%)		22 (37,3%)
Alter in Jahren	89		59	
Durchschnitt		68,1		62,6
Strebweite		43 – 90		40 – 79
< Durchschnitt		39 (43,8%)		25 (42,4%)
≥ Durchschnitt		50 (56,2%)		34 (57,6%)
Tumorassoziierte Parameter				
Tumorlokalisation	89			
Caecum		9 (10,1%)		
Colon ascendens		20 (22,5%)		
Colon transversum		13 (14,6%)		
Colon descendens		5 (5,6%)		
Colon sigmoideum (Sigma)		34 (38,2%)		
Rektum (> 12 cm ab ano)		8 (9,0%)		
Kolon, nicht spezifiziert		0 (0,0%)		
Doppelkarzinom Kolon		0 (0,0%)		
Tumorgröße in cm	89		56	
Durchschnitt		4,7		3,93
Strebweite		1,2 – 11,5		0,9 – 16,0
Anzahl an Lebermetastasen			56	
1				18 (32,1%)
>1				38 (67,9%)
Histologischer Tumortyp	89		58	
Adenokarzinom		75 (84,3%)		52 (89,7%)
Muzinöses Adenokarzinom		14 (15,7%)		6 (10,3%)
Siegelringzellkarzinom		0 (0,0%)		0 (0,0%)
Grading	89		55	
G1		2 (2,2%)		0 (0,0%)
G2		55 (61,8%)		36 (65,5%)
G3		31 (34,8%)		19 (34,5%)
G4		1 (1,1%)		0 (0,0%)
Tumorstatus (Primärtumor)	89			
pT1		3 (3,4%)		
pT2		13 (14,6%)		
pT3		60 (67,4%)		
pT4		13 (14,6%)		
Lymphknotenstatus (Primärtumor)	89			
pN0		57 (64,0%)		
pN1		20 (22,4%)		
pN2		12 (13,5%)		
Metastasenstatus (Primärtumor)	89			
cM0		75 (84,3%)		
cM1		14 (15,7%)		

Ergebnisse

Fortsetzung		Kolorektale Karzinome		Lebermetastasen
Tumorassoziierte Parameter	n		n	
UICC-Klassifikation	89			
I		16 (18,0%)		
IIA		31 (34,8%)		
IIB		6 (6,7%)		
IIIA		1 (1,1%)		
IIIB		15 (16,9%)		
IIIC		6 (6,7%)		
IV		14 (15,7%)		
Lymphangiosis carcinomatosa	55		36	
L0		38 (69,1%)		17 (47,2%)
L1		17 (30,9%)		19 (52,8%)
Gefäßstatus	55		35	
V0		49 (89,1%)		26 (74,3%)
V1		6 (10,9%)		9 (25,7%)
Perineurale Invasion	20		5	
Pn0		15 (75,0%)		3 (60,0%)
Pn1		5 (25,0%)		2 (40,0%)
Therapieassoziierte Parameter				
R-Klassifikation (Residual)	89		59	
R0		85 (95,5%)		47 (79,7%)
R1		3 (3,4%)		7 (11,9%)
R2		1 (1,1%)		2 (3,4%)
Rx *		0 (0,0%)		3 (5,1%)
Vorausgegangene Chemotherapien	89		56	#
Ja		0 (0,0%)		43 (76,8%)
Nein		89 (100%)		13 (23,2%)

Tabelle 7. Patientencharakterisierung. Abweichende Fallzahlen (n) aufgrund nicht komplett vorhandener Daten kursiv markiert. * Probeexzision, keine kurative operative Therapie.

Anhand Krankenakteinsicht erhobene stattgehabte Chemotherapien des Primärtumors. Grau hinterlegte Felder: Daten gelten nur für den jeweiligen anderen Gewebetyp (Primarius bzw. Lebermetastase).

Das Kollektiv der kolorektalen Primärtumore verteilte sich bezüglich des Geschlechtes in einem Verhältnis von männlich zu weiblich von 1,28:1, das der Lebermetastasen von 1,68:1; der Altersdurchschnitt des Patientengutes lag bei 68,1 beziehungsweise 62,6 Lebensjahren respektive, wobei in beiden Gewebearten rund 57% der Fälle über dem Altersdurchschnitt waren. Die Streubreite des Erkrankungsalter erstreckte sich bei den Primärtumoren von 43 bis 90 Jahren, bei den Lebermetastasen darunter, von 40 bis 79 Jahren. Bezüglich der kolorektalen Primärtumore war die Tumorlokalisation in der Mehrzahl im Bereich des Colon sigmoideum (38,2%), jedoch nahezu gleichverteilt zwischen rechtem und linkem kolorektalen Abschnitt (rechts: Caecum, Colon ascendens et transversum zu 47,2% versus links: Colon descendens, sigmoideum und oberes Rektumdrittel zu 52,8%). Die Tumorgröße war im Durchschnitt bei den Primaria höher (4,7 cm) als bei den Lebermetastasen (3,9 cm), die Streubreite jedoch weiter (10,3 cm Schwankung versus 15,1 cm respektive). Die Mehrzahl der an metastasiertem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten hatten bereits mehr als eine hepatische Absiedelungen (rund 68%). Bezüglich des histologischen Typs

waren die Malignome überwiegend Adenokarzinome, nur 15,7% der Primärtumore und 10,3% der Lebermetastasen entfielen auf den muzinösen Typ; Siegelringzellkarzinome waren nicht vertreten. Der größte Anteil der kolorektalen Malignome (rund 65% in beiden Gewebearten) zeigte eher gut differenzierte Tumorzellen (Grading G1 bis G2 im Vergleich zu 35% mit G3 bis G4). Die Tiefeninvasion (entsprechend Tumorstadium T) betreffend, waren die Primärtumore größtenteils als fortgeschritten einzustufen (82% mit Stadium T3 und T4), nur 18% waren oberflächlich (T1 und T2). Mehr als die Hälfte der untersuchten Patienten (64%) hatten einen negativen Lymphknotenstatus (N0) und nur knapp 16% wiesen bei Erstdiagnose des Primärtumors bereits Metastasen auf (M1). Demnach stellt sich auch die Verteilung des UICC-Stadiums am Kollektiv dar, mit rund 60% der Fälle in den Anfangsstadien I und II und 40% im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (III und IV). Eine Infiltration der Lymphgefäßbahnen (Lymphangiosis carcinomatosa) war beim Primärtumor nicht so häufig wie bei den Lebermetastasen (31% versus 53%). Eine tumoröse Gefäßbeteiligung (V) sowie perineurale Invasion (Pn) zeigten sich (wenn untersucht bzw. Daten vorhanden) in beide Geweben selten. Der überwiegende Anteil (95,5%) der Primärtumore wurde im Gesunden entfernt (das heißt ohne Residualtumor, entspricht R0), nur wenige zeigten mikroskopisch (R1) oder makroskopisch (R2) befallene Resektionsränder (4,5%); bei den kolorektalen Lebermetastasen beliefen sich die R0-resezierten Fälle auf knapp 80%. Drei von 59 metastatischen Geweben (5,1%) waren lediglich eine Probeexzisionen (Operation ohne Intension einer vollständigen Entfernung). Alle kolorektalen Primaria waren ohne neoadjuvanter Therapie (siehe Einschlusskriterien Abschnitt 2.1.1., Seite 11), 76,8% der Lebermetastasen stammten aus einem bereits zu einem früheren Zeitpunkt behandelten Patienten (Zustand nach Chemotherapie des Primärtumors).

3.2. Methodische Etablierungsphase

3.2.1. Vergleich der verschiedenen HER2/neu-Antikörper untereinander

Klon CB11 versus Klon N12

Sowohl die spezifische membranöse Färbung und ihre Intensität als auch die unspezifische Anfärbung von Zellkompartimenten waren zwischen den zwei Antikörperklonen verschieden. Während die spezifisch membranöse Färbung sich in den malignen Geweben nur um wenige Prozentzahlen unterschieden (18% vs. 22% bei Primärtumor und 21,1% vs.

Ergebnisse

26,3% bei den Lebermetastasen), fand sich in der gutartigen Dickdarmschleimhaut ein deutlicher Unterschied von 18% (4% vs. 22%). Die unspezifische Färbung betreffend, wies der Klon N12 in jeder Gewebeart, speziell aber auf Mukosa- (40 Fälle, =80,0%) und auf Primärtumorpräparate (35 Fälle, =70%) einen weitaus höheren Anteil auf als der Klon CB11. In den Lebermetastasen war das Vorkommen unspezifischer Färbung mit dem Klon N12 etwas geringer (44,7%) als auf den Mukosa- und Tumorpräparaten, aber dennoch mehr als mit dem Klon CB11 (15,8%). Zudem zeigte der extrazellulär bindende HER2/neu-Antikörperklon N12 in allen Gewebearten eine um einiges stärkere durchgängige Hintergrundfärbung der gesamten Gewebeschnitte als der Klon CB11 (**Tabelle 8**).

Gewebe	Färbung	Antikörperklon	
		CB11	N12
Mukosa n = 50	spezifisch	4,0 %	22,0 %
	unspezifisch *	18,0 %	80,0 %
	Hintergrund	±	++
Primärtumor n = 50	spezifisch	18,0 %	22,0 %
	unspezifisch *	12,0 %	70,0 %
	Hintergrund	±	++
Lebermetastase n = 50	spezifisch	26,3 %	21,1 %
	unspezifisch *	15,8 %	44,7 %
	Hintergrund	±	++

Tabelle 8. Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv CB11 vs. N12 unterteilt in spezifisch membranöser, unspezifischer sowie Hintergrundfärbung. * mindestens ein unspezifisches Färbemuster vorhanden, auch mehrfaches möglich. Hintergrundfärbung quantifiziert in ± wenig, + mäßig und ++ stark.

Die detaillierten spezifischen und unspezifischen Färbeergebnisse der zwei Antikörperklone werden in **Tabelle 9** (Seite 29) vorgestellt. In allen Gewebearten zeigte sich überwiegend eine basolaterale oder laterale spezifische membranöse Färbung, mit dem Klon N12 konnte in einigen Fällen zusätzlich eine komplette Membranfärbung beobachtet werden (4 Mal in der Mukosa, 3 Mal im Primärtumor und 2 Mal in Lebermetastasen). Die unspezifische Färbung unterschied sich unter den Antikörper bei einem Überwiegen auf Seiten des Klons N12 in allen Gewebearten, vor allem im Muzin (insgesamt 53 Mal vs. 3 Mal mit CB11) und bei der feinkörnigen granulären Anfärbung der Epithelzellen (83 Mal mit N12 vs. 20 Mal mit CB11), jedoch Beides in der Mukosa am höchsten. Eine isoliert basale oder luminale Membranfärbung war mit beiden Antikörpern nur vereinzelt vorhanden. Eine zytoplasmatische Färbung gab es nur mit dem Klon N12, der Nukleus war nie gefärbt.

Ergebnisse

Gewebe	n	Anti-körper	Färbemuster der Epithelzellen						
			spezifisch membranös		unspezifisch				
			komplett membranös	basolateral/lateral membranös	basal/luminal membranös	zytoplasmatisch	nukleär	granulär	muzinös
Mukosae	50	CB11	0	2	1	0	0	9	1
		N12	4	11	1	4	0	36	35
Primärtumore	50	CB11	0	9	0	0	0	6	2
		N12	3	11	1	2	0	32	13
Lebermetastasen	38	CB11	1	10	1	1	0	5	0
		N12	2	8	0	2	0	15	5

Tabelle 9. Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters von CB11 und N12 in spezifisch membranös und unspezifisch in den drei Gewebearten (Antikörperkonzentrationen CB11: 0,26µg/ml, N12: 0,25µg/ml).

Die HER2/neu-Nachweishäufigkeit, sprich spezifische Färbung wurde bereits oben anhand **Tabelle 8** beschrieben. Der Median der Prozentzahl positiver Zellen und die Streubreite verhielt sich entsprechend, also zugunsten des Klon N12 in der Mukosa. Die Gesamtergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit den Klonen CB11 und N12 werden in **Tabelle 10** zusammengefaßt.

Bezüglich der Färbeintensität konnte bei vergleichbarer Antikörperkonzentration (CB11: 0,26µg/ml, N12: 0,25µg/ml) mit dem Klon N12 höhere Scores verbucht werden. Während mit dem Klon CB11 bei 13 von 21 positiven Proben niedrige Scores beobachtet wurden (61,9% waren Score 1+), waren 28 von 30 positiven Gewebe mit N12 in den höheren Scores 2+ und 3+ angesiedelt (93,3% waren Score 2+ und 3+).

Anti-körper	Gewebe	n	Spezifische Epithelzellfärbung					
			Nachweishäufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streubreite)	Score			
					0	1+	2+	3+
CB11	Mukosae	50	2 (4,0%)	15,0% (10-20)	48	2	0	0
	Tumore	50	9 (18,0%)	20,8% (2-70)	41	7	1	1
	Metastasen	38	10 (26,3%)	22,0% (5-100)	28	4	5	1
N12	Mukosae	50	11 (22,0%)	32,9% (2-100)	39	1	7	3
	Tumore	50	11 (22,0%)	27,3% (5-100)	39	0	9	2
	Metastasen	38	8 (21,1%)	27,8% (2-55)	30	1	3	4

Tabelle 10. Gesamtergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit den Klonen CB11 und N12. Nachweishäufigkeit widerspiegelt die Anzahl an spezifisch positiven Geweben (sowie Prozentsatz des Gesamtkollektives n). Median gibt den Durchschnitt der Prozentzahlen an spezifisch positiver Epithelzellen an (sowie deren Streubreite). Unter Score steht die Anzahl des jeweilig vergebenen Score am positiv befundeten Kollektiv (= Nachweishäufigkeit) bzw. Score 0 bei negativem Präparat oder unspezifischer Färbung.

Klon CB11 versus Klon 4B5

In einem zweiten Etablierungsschritt wurde der ebenfalls intrazellulär bindende 4B5-Klon⁷⁴ im Vergleich zum Klon CB11 eingesetzt. Dieser wurde in der empfohlenen Konzentration von 1,5 µg/ml angewendet, entsprechend wurden die Untersuchungsbedingungen im Kollektiv von 39 autologen Mukosae und Primärtumore sowie 20 Lebermetastasen (gesamt 98 Gewebepräparate) für den Klon CB11 zum direkten Vergleich angeglichen.

Eine spezifische Membranfärbung konnte mit dem Klon 4B5 in allen drei Gewebearten deutlich häufiger entdeckt werden, am höchsten bei den Primärtumoren mit 51,3% im Gegensatz zu 2,6% mit dem Klon CB11 (Gesamtkollektiv 29/98, =29,6% vs. 2/98, =2,0%). Bei den Kolonschleimhäuten und den Lebermetastasen waren die Sprünge geringer (respektive 7,7% vs. 0% bzw. 30% vs. 5%). In Bezug auf die unspezifische Färbung, war die Diskrepanz zwischen den zwei hier gegenüberstehenden Antikörper CB11 und 4B5 deutlich geringer als im obigen Vergleich zwischen den Klonen CB11 und N12. Allerdings zeigte sich auch hier der Antikörper CB11, auch in der vergleichbaren höheren Konzentration von 1,5 µg/ml, in der Mukosa und den Lebermetastasen mit einer nahezu halb so hohen unspezifischen Färbung als der Klon 4B5 (38,4% vs. 64,1% und 35% vs. 70%), im Primärtumor sogar im Verhältnis eins zu drei (33,3% vs. 92,3%). Somit zeigte der Klon CB11 den geringsten Anteil spezifischer und unspezifischer Färbung. Insgesamt war der 4B5-Klon zufriedenstellend und dem CB11-Klon deutlich näher als der oben analysierte Klon N12 (**Tabelle 11**).

Gewebe	Färbung	Antikörperklon	
		CB11	4B5
Mukosa n = 39	spezifisch	0,0 %	7,7 %
	unspezifisch *	38,5 %	64,1 %
	Hintergrund	±	± / +
Primärtumor n = 39	spezifisch	2,6 %	51,3 %
	unspezifisch *	33,3 %	92,3 %
	Hintergrund	±	± / +
Lebermetastase n = 20	spezifisch	5,0 %	30,0 %
	unspezifisch *	35,0 %	70,0 %
	Hintergrund	±	+

Tabelle 11. Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv CB11 vs. 4B5 unterteilt in spezifisch membranöser, unspezifischer sowie Hintergrundfärbung. * mindestens ein unspezifisches Färbemuster vorhanden, auch mehrfaches möglich. Hintergrundfärbung quantifiziert in ± wenig, + mäßig und ++ stark.

Ergebnisse

Auch bei diesem Vergleich wurde bereits oben auf die Verteilung der spezifischen Färbung eingegangen. Während mit dem Klon CB11 keine komplette zirkuläre membranöse Färbung gesehen wurde, konnte mit dem 4B5-Antikörper jeweils bei einigen der positiven Exemplare sowohl eine basolaterale/laterale als auch gleichzeitig komplette membranöse Färbung gesehen werden (Mukosa 1 Mal, Primärtumor 6 Mal, Lebermetastase 2 Mal). Dies zeigt, dass das HER2/neu-Färbemuster nicht selten heterogen war, wobei in allen Fällen eine basolaterale/laterale membranöse Färbung überwog. Insgesamt war die nicht zu wertende unspezifische Färbung bei beiden Klonen vor allem im Zytoplasma und Muzin zu finden, und das vermehrt mit dem Klon 4B5 (54 Gewebeproben vs. 20 mit dem Klon CB11 im Zytoplasma bzw. 35 vs. 13 Proben mit positivem Muzin). Interessanterweise bestand nur mit dem Klon 4B5 in 7 Primärtumoren und 3 Lebermetastasen eine unspezifische isoliert basale oder luminale Membranfärbung. Die granuläre Färbung zeigte sich ebenso vermehrt mit dem Klon 4B5 (35 Mal vs. 11 Mal mit dem Klon CB11). Eine nukleäre Färbung wurde nie beobachtet (**Tabelle 12**).

Gewebe	n	Anti-körper	Färbemuster der Epithelzellen						
			spezifisch membranös		unspezifisch				
			komplett membranös	basolateral/lateral membranös	basal/luminal membranös	zytoplasmatisch	nukleär	granulär	muzinös
Mukosae	39	CB11	0	0	0	6	0	2	10
		4B5	1	2	0	14	0	7	20
Primärtumore	39	CB11	0	1	0	8	0	4	2
		4B5	6	19	7	28	0	21	12
Lebermetastasen	20	CB11	0	1	0	6	0	5	1
		4B5	2	6	3	12	0	7	3

Tabelle 12. Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters von CB11 und 4B5 in spezifisch membranös und unspezifisch in den drei Gewebearten (Antikörperkonzentration jeweils 1,5 µg/ml).

Ein direkter Vergleich der Verteilung der Färbeintensität (Score) entfällt bei nahezu komplett HER2/neu-negativem Kollektiv mit CB11. Entsprechend zeigen sich positive Scores mit dem Klon 4B5. Erwähnenswert sind dennoch die elf Fälle mit Score 3+, darunter zehn in malignen Geweben. Dabei überwiegt der Score 2+ im kolorektalen Primärtumor und der Score 3+ bei den Lebermetastasen (**Tabelle 13**).

Ergebnisse

Anti-körper	Gewebe	n	Spezifische Epithelzellfärbung					
			Nachweis-häufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streubreite)	Score			
					0	1+	2+	3+
CB11	Mukosae	39	0 (0%)	0% (0)	39	0	0	0
	Tumore	39	1 (2,6%)	5% (5)	38	0	1	0
	Metastasen	20	1 (5%)	7% (7)	19	0	1	0
4B5	Mukosae	39	3 (7,7%)	2% (2)	36	1	1	1
	Tumore	39	20 (51,3%)	8,4% (1-70)	19	4	10	6
	Metastasen	20	6 (30%)	9,2% (5-17)	14	0	2	4

Tabelle 13. Ergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit den Klonen CB11 und 4B5 am Vergleichskollektiv (n=39 bzw. n=20) mit der Antikörperkonzentration 1,5µg/ml. Nachweishäufigkeit widerspiegelt die Anzahl an spezifisch positiven Geweben (sowie Prozentsatz des Kollektivs n). Median gibt den Durchschnitt der Prozentzahlen spezifisch positiver Epithelzellen an (sowie deren Streubreite). Unter Score steht die Anzahl des jeweilig vergebenen Score am positiv befundeten Kollektiv (= Nachweishäufigkeit) bzw. Score 0 bei negativem Präparat oder unspezifischer Färbung.

Bei 29 von den insgesamt 98 untersuchten Gewebeschnitten zeigten die vergleichend analysierten Antikörperklone CB11 und 4B5 einen Unterschied in der Prozentzahl spezifisch positiver Epithelzellen (=29,6% der Fälle). Diese Unterschiede wurden zur besseren Visualisierung in einem Bland-Altman-Plot⁸⁰ (**Abbildung 6**) aufgetragen. Punkte über null geben einen höheren 4B5-Wert wider, Punkte darunter bedeuten ein Überwiegen des CB11-Wertes im Schnittpräparat.

Alle Ergebnisabweichungen waren Seitens des 4B5-Klons, das heißt 4B5 war jeweils in einer höheren Prozentzahl positiver Epithelzellen vertreten, was sich bereits in den **Tabellen 11 bis 13** (siehe ab Seite 30) widerspiegelt. Die Mehrzahl der Unterschiede im prozentualen Anteil lagen jedoch nahe dem Durchschnitt (mean) und innerhalb der zweifachen Standardabweichung (25 von 29, =86,2%). Die Differenzierung in Gewebearten zeigte, dass überwiegend die Ergebnisse der Primärtumore verschieden waren (20 von 29, = 69,0% der Abweichungen), während die Mukosaproben und Lebermetastasen sehr wenig Unterschiede zwischen dem CB11- und dem 4B5-Nachweis aufwiesen (jeweils nur 3 und 6 Fälle von 98). Nur vier Gewebeproben lagen oberhalb der zweifachen Standardabweichung, drei davon waren Primärtumore.

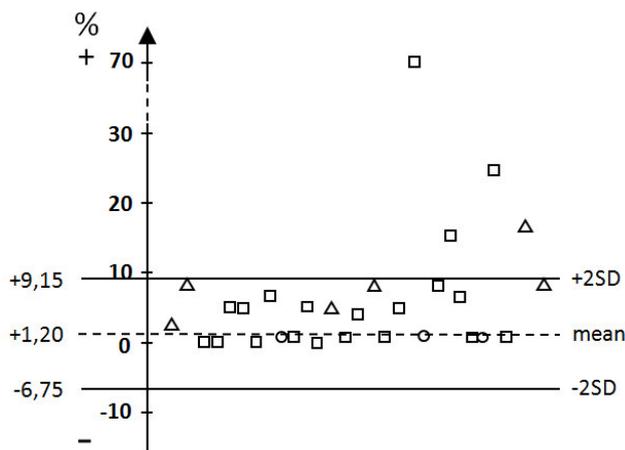


Abbildung 6. Bland-Altman-Plot⁸⁰ für Prozent spezifisch positiver membranöser Epithelzellfärbung. Hier werden die Unterschiede der Färbeargebnisse zwischen den Klonen 4B5 und CB11 auf den HER2/neu positiven Gewebeproben (29 von 98 Geweben) dargestellt. SD bezeichnet die Standardabweichung, mean den Durchschnitt. Kreise symbolisieren Mukosaschnitte, Rechtecke Primärtumore und Dreiecke Lebermetastasen.

Den Scorewert betrachtet, gab es 28 Unterschiede (= 28,6%) zwischen CB11 und 4B5. Auch hier zeigte sich ein deutliches Überwiegen der 4B5-Färbung, die Aufteilung der Gewebearten war identisch zu den bereits beschriebenen Unterschieden im Prozentsatz positiver Epithelzellen und betraf vor allem Primärtumorgewebe. Ausreißer außerhalb der zweifachen Standardabweichung betrafen ebenfalls überwiegend Primärtumorproben.

Zusammenfassend war also der Primärtumor als Gewebeart für Diskrepanzen zwischen den zwei Antikörperklonen am anfälligsten.

Die drei Antikörperklone auf weiteren Zellarten

Neben der spezifischen epithelialen Zellfärbung wurden auch Färbeeigenschaften von weiteren Zelltypen untersucht. Dabei wurde die Färbeintensität der ebenso im Gewebe befindlichen Zellarten wie Fibroblasten, sich überwiegend im Bindegewebe befindliche Leukozyten, Endothelzellen an vorhandenen Gefäßanschnitten, Myozyten der glatten Muskulatur der Muscularis mucosae sowie Hepatozyten auf dem Leberreferenzgewebe beobachtet.

Alle drei Antikörper zeigten eine unterschiedlich starke unspezifische zytoplasmatische oder granuläre Anfärbung der Hepatozyten, nur der 4B5-Klon wies weitere Reaktionen auf Myozyten und Endothelzellen auf. Insgesamt betrachtet war der CB11-Klon mit einer nur schwachen Leberzellanfärbung der spezifischste epitheliale Antikörper, indem er an andere Zellarten nicht band. **Tabelle 14** fasst die Färbereigenschaften von nicht epithelialen Zellarten zusammen.

Ergebnisse

Anti-körper	Färbelokalisation	Leuko-zyten	Fibro-blasten	Endothel-zellen	Myo-zyten	Hepato-zyten
CB11	Komplett membranös oder basolateral/lateral membranös	-	-	-	-	-
	Zytoplasmatisch oder granulär	-	-	-	-	±
N12	Komplett membranös oder basolateral/lateral membranös	-	-	-	-	-
	Zytoplasmatisch oder granulär	-	-	-	-	++
4B5	Komplett membranös oder basolateral/lateral membranös	-	-	-	-	-
	Zytoplasmatisch oder granulär	-	-	±	±	+

Tabelle 14. Färbeeigenschaften der drei HER2/neu-Antikörper auf verschiedene nicht epitheliale Zelltypen (- negativ, ± wenig, + mäßig, ++ stark).

Zusammenstellend zeigt **Abbildung 7** die drei HER2/neu-Antikörper auf dem gleichen Primärtumor- (a-c) bzw. Lebermetastasenareal (d-f), wobei auf die höhere Arbeitskonzentration von 4B5 (1,5µg/ml versus 0,25µg/ml bei N12 und 0,26 µg/ml bei CB11) hingewiesen werden muss. Ersichtlich ist eine unterschiedliche spezifisch membranöse Anfärbung der Tumorepithelzellen sowohl im prozentualer Anteil als auch in der Färbeintensität: der untersuchte Tumor zeigte sich mit 4B5 deutlich HER2/neu-positiver als mit den anderen Klonen (Bild c mit offensichtlichem Score 3+ versus Bilder a und b), die hier gezeigte Lebermetastase wies eine deutlich intensivere spezifisch positive Membranfärbung mit dem Klon N12 auf (Bild e) als mit den zwei anderen Antikörperklonen (Bilder d und f). Auch die unspezifische Färbung war verschieden: der Klon CB11 zeigte im Primärtumor (Bild a) ein granuläres Färbemuster, wohingegen der Klon N12 (Bild b) basal cytoplasmatisch band. Lediglich die Leberzellen im Referenzgewebe waren in allen Proben und mit allen drei Antikörpern durchgehend angefärbt. Eine verdunkelnde generelle Hintergrundfärbung wurde bei den mit N12 inkubierten Objektträgern am stärksten beobachtet; im Gegensatz beachte man die vergleichbar gute Qualität der 4B5-inkubierten Präparate obwohl es sich dabei um eine deutlich höhere Antikörperkonzentration (1,5µg/ml) im Vergleich zu den anderen Klonen handelt.

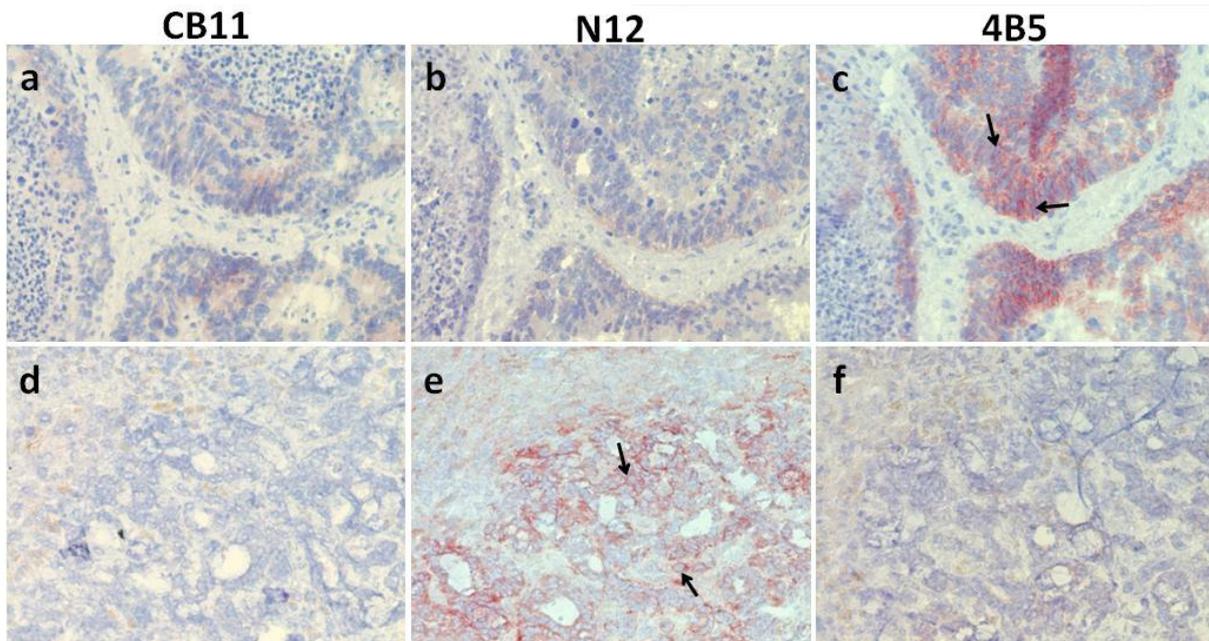


Abbildung 7. Direkte Gegenüberstellung der drei Antikörper auf gleiches repräsentatives Gewebeareal: HER2/neu-Kryoimmunhistochemie in 20-facher Vergrößerung. Serienschritte eines primären sigmoidalen Adenokarzinoms (a, b, c) sowie einer kolorektalen Lebermetastase (d, e, f) gefärbt mit den drei Antikörperklone CB11 (a, d), N12 (b, e) und 4B5 (c, f). Die Pfeile deuten auf spezifische membranöse Färbung.

Zusammenfassend erwies sich der Klon N12 als methodisch ungeeignetster Antikörper: auch wenn die spezifische Färbung vergleichbar mit der des Klons CB11 war, bestand durchgehend sowohl eine deutlich höhere unspezifische als auch eine störende Hintergrundfärbung des gesamten Präparates, welche die Auswertung erheblich erschwerte. Aus diesem Grund wurde der Antikörperklon N12 bei den weiterführenden HER2/neu-Analysen verworfen. Für weitere Untersuchungen fiel die Entscheidung aufgrund der bestehenden Zulassung für diagnostische Zwecke⁴² sowie den vergleichbaren Ergebnisse mit dem Klon CB11 auf den Klon 4B5.

Von nun an werden ausschließlich HER2/neu-Ergebnisse des Antikörperklon 4B5 verwendet.

3.2.2. Vergleich Kryo- mit Paraffinimmunhistologie

Anhand des 4B5-Antikörpers (Arbeitskonzentration 1,5µg/ml) und in reduzierter Fallzahl (n=65 Gewebeproben), wurden die zwei immunhistochemischen Verfahren Kryo- versus Paraffinhistologie verglichen.

Insgesamt überwiegt die Paraffinimmunhistologie sowohl bei der spezifischen als auch unspezifischen Färbung in allen drei Gewebearten deutlich: die spezifische

Ergebnisse

Nachweishäufigkeit war insbesondere in der Mukosa um das Fünffache höher (19% vs. 100%), im Primärtumor um das Zweifache (44,4% vs. 81,5%). Nur bei den Lebermetastasen waren die Anteile an positiven Gewebe vergleichbar hoch (58,2% vs. 64,7%). Speziell die unspezifische Färbung betreffend, ist die Häufigkeit in beiden Färbeverfahren vergleichbar mit leichter Tendenz zum Überwiegen der Paraffinhistologie: beide wiesen einen hohen Prozentsatz an unspezifischer Zellfärbung auf (im Mittel: Mukosa 95%, Primärtumor 87%, Lebermetastasen 70%). Eine durchgehende Präparatanfärbung (Hintergrundfärbung) ist bei der Paraffin- im Vergleich zur Kryohistologie durch das vollständige Einbetten des Gewebes nicht vorhanden (**Tabelle 15**).

Gewebe	Färbung	Immunhistochemie	
		Kryohistologie	Paraffinhistologie
Mukosa n = 21	spezifisch	19,0 %	100 %
	unspezifisch *	81,0 %	100 %
	Hintergrund	± / +	-
Primärtumor n = 27	spezifisch	44,4 %	81,5 %
	unspezifisch *	85,2 %	88,9 %
	Hintergrund	± / +	-
Lebermetastase n = 17	spezifisch	58,2 %	64,7 %
	unspezifisch *	70,6 %	70,6 %
	Hintergrund	+	-

Tabelle 15. Prozentzahl der Ergebnisse im Vergleichskollektiv Kryo- vs. Paraffinimmunhistologie (Klon 4B5) unterteilt in spezifisch membranöser, unspezifischer sowie Hintergrundfärbung. * mindestens ein unspezifisches Färbemuster vorhanden, auch mehrfaches möglich. Hintergrundfärbung quantifiziert in - keine, ± wenig, + mäßig und ++ stark.

Bei genauer Unterteilung der spezifischen positiven Färbung fällt ein häufigeres Auftreten einer kompletten zirkulären Membranfärbung in der Paraffinhistologie auf (in allen Gewebe mindestens einmal vorhanden, am häufigsten in 4 von 11 positiven Fällen bei den Lebermetastasen, =36,4%). Die unspezifische Färbung betreffend, ist eine zytoplasmatische Färbung insbesondere bei der Paraffinhistologie zu sehen (55 Mal im Vergleich zu 13 mit der Kryohistologie), eine granuläre Färbung wiederum lediglich in einer Lebermetastase und dafür vermehrt in der Gefrierschnitthistologie. Eine muzinöse Färbung ist in beiden Verfahren vergleichbar häufig. Eine nukleäre oder unspezifische isoliert basale oder lumenale Membranfärbung konnte nahezu nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

Gewebe	n	Histo- logie	Färbemuster der Epithelzellen						
			spezifisch membranös		unspezifisch				
			komplett membranös	basolateral/ lateral membranös	basal/ luminal membranös	zyto- plasmatisch	nukleär	granulär	muzinös
Mukosae	21	Kryo	4	4	0	1	0	11	16
		Paraffin	1	21	0	21	0	0	21
Primär- tumore	27	Kryo	2	12	1	9	0	17	14
		Paraffin	5	21	0	23	0	0	17
Leber- metastasen	17	Kryo	0	10	0	3	0	10	2
		Paraffin	4	11	0	11	0	1	4

Tabelle 16. Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters beider immunhistologischen Verfahren anhand des Klons 4B5 in spezifisch membranös und unspezifisch in den drei Gewebearten (Arbeitskonzentration 1,5µg/ml).

Die Scores betreffend, fällt bei der Kryohistologie eine ausgeglichene Verteilung zwischen Score 2+ und 3+ auf (22 von 25 positiven Fällen, =88%), wohingegen der Score 1+ bei der Paraffinhistologie überwiegt (27 von 53 positiven Fällen, =50,9%). Der hohe Score 3+ wurde dabei auch nur in einer Lebermetastase vergeben im Vergleich zu immerhin 11 malignen Geweben mit der Kryohistologie. Somit zeigt sich die Paraffinhistologie zwar häufiger positiv, jedoch mit deutlich schwächerem Score (**Tabelle 17**).

Histo- logie	Gewebe	n	Spezifische Epithelzellfärbung					
			Nachweis- häufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streubreite)	Score			
					0	1+	2+	3+
Kryo	Mukosae	21	4 (19%)	18,5% (2-60)	17	1	2	1
	Tumore	27	12 (44,4%)	21,0% (1-80)	15	1	5	6
	Metastasen	17	9 (58,2%)	27,2% (5-100)	8	1	3	5
Par- affin	Mukosae	21	21 (100%)	68,6% (5-100)	0	9	10	2
	Tumore	27	21 (77,8%)	34,3% (1-90)	6	12	9	0
	Metastasen	17	11 (64,7%)	36,0% (5-100)	6	6	4	1

Tabelle 17. Vergleich der spezifischen Ergebnisse von Kryo- und Paraffinhistologie (mit dem Klon 4B5).

Bezüglich der spezifischen HER2/neu-Färbung zeigte sich bei 53 der insgesamt 65 Kryo- versus Paraffinhistologie vergleichend untersuchten Gewebeproben ein Unterschied in der Prozentzahl spezifisch positiver Epithelzellen (= 81,5% der Fälle) und bei 50 von 65 Fällen (entsprechend 76,9%) Unterschiede beim Score. Mit der Paraffinhistologie wurden jeweils mehr spezifisch positive Zellen im Gewebepräparat gezählt als bei der Kryohistologie (Spalte „Kryo < Paraffin“ in **Tabelle 18** und somit Punkte über der Nulllinie im Bland-Altman-Plot⁸⁰, **Abbildung 9** siehe unten und Seite 39). Bei der Score-Vergabe überwog das andere Färbeverfahren nahezu gleich oft außer bei der Mukosa.

Ergebnisse

	Gewebe	n	Kryo > Paraffin	Kryo = Paraffin	Kryo < Paraffin
%	Mukosae	21	1	0	20
	Primärtumore	27	3	6	18
	Lebermetastasen	17	4	6	7
Score	Mukosae	21	2	2	17
	Primärtumore	27	10	6	11
	Lebermetastasen	17	6	7	4

Tabelle 18. Grober Vergleich der Fälle beider Verfahren Kryo- und Paraffinhistologie (Klon 4B5) anhand der Ergebnisse spezifisch positiver Epithelzellen (%) und Score, in Überwiegen des einen oder anderen beziehungsweise gleich sein.

In **Abbildung 8** sind alle Ergebnisse der Kryo- und Paraffinhistologie (n=65) in Prozentzahl HER2/neu-positiver Epithelzellen fallbezogen in einem Koordinatensystem aufgetragen. In dieser Grafik wird das Überwiegen der paraffin- gegenüber den kryohistologischen Ergebnissen ersichtlich (Punkte liegen vermehrt im linken Grafikbereich). Ein errechneter Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten bestätigt, dass die Ergebnisse nicht signifikant korrelieren ($r=-0,28$).

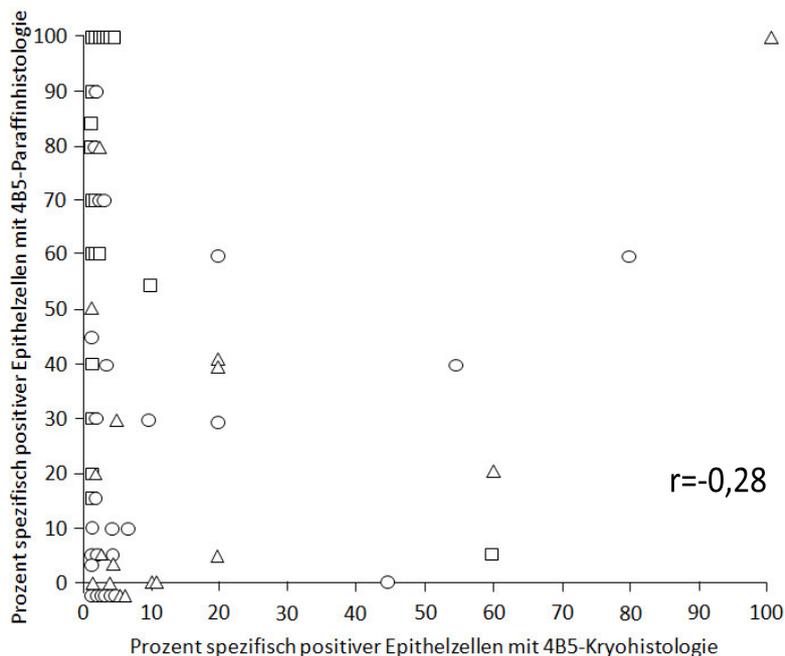


Abbildung 8. Prozentualer Anteil spezifisch positiver Epithelzellen mit der Kryohistologie (Abszisse) gegenüber dem Anteil mit der Paraffinhistologie (Ordinate) anhand des Klons 4B5. Rechtecke symbolisieren Mukosaschnitte, Kreise Primärtumore und Dreiecke Lebermetastasen. Übereinanderliegende Symbole haben den gleichen Wert des Untersten. Der Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient $r=-0,28$ zeigt keine signifikante Korrelation.

Die in **Tabelle 18** (siehe oben) als Stückzahl an Gewebeproben dargestellten Unterschiede im Prozentzahl HER2/neu-positiver Epithelzellen wurden in einem Bland-Altman-Plot⁸⁰ (**Abbildung 9**, siehe unten) aufgetragen und veranschaulicht. Punkte über null geben einen höheren Prozentsatz positiver Zellen in der Paraffinhistologie wider, Punkte darunter bedeuten ein Überwiegen der Prozentzahl in der Kryohistologie. Auch mittels dieser

Ergebnisse

Darstellung wird ersichtlich, dass die Ergebnisabweichungen überwiegend Seitens der Paraffinhistologie ($n=45$, entsprechend Zahlen in **Tabelle 18**, Seite 38) lagen und zeigten sich zudem stark verstreut: nur knapp über die Hälfte der Fälle lagen innerhalb der zweifachen Standardabweichung (29 von 53, =54,7%), 24 von 53 (=45,3%) lagen darüber oder auch seltener darunter. Die Differenzierung in Gewebearten zeigte, dass die Ergebnisse der Mukosae (21 von 21, =100%) grundsätzlich unterschiedlich waren, gefolgt von den Lebermetastasen mit 6 von 17 unterschiedlichen Proben (=35,3%) und zuletzt den Primärtumoren mit 22,2% Unterschiede (6 von 27).

Bei der Färbeintensität und Score-Vergabe, wurden mit der Paraffinhistologie in malignen Geweben geringere Werte vergeben als mit dem Gefrierschnittverfahren. Während nur 14 von 32 (43,8%) positiven malignen Geweben in der Paraffinhistologie einen höheren Score 2+ oder 3+ erhielten, wurden 19 von 21 (90,5%) positiv befundeten Tumoren oder Metastasen einen Score größer/gleich 2+ verliehen (**Tabelle 17**, Seite 37).

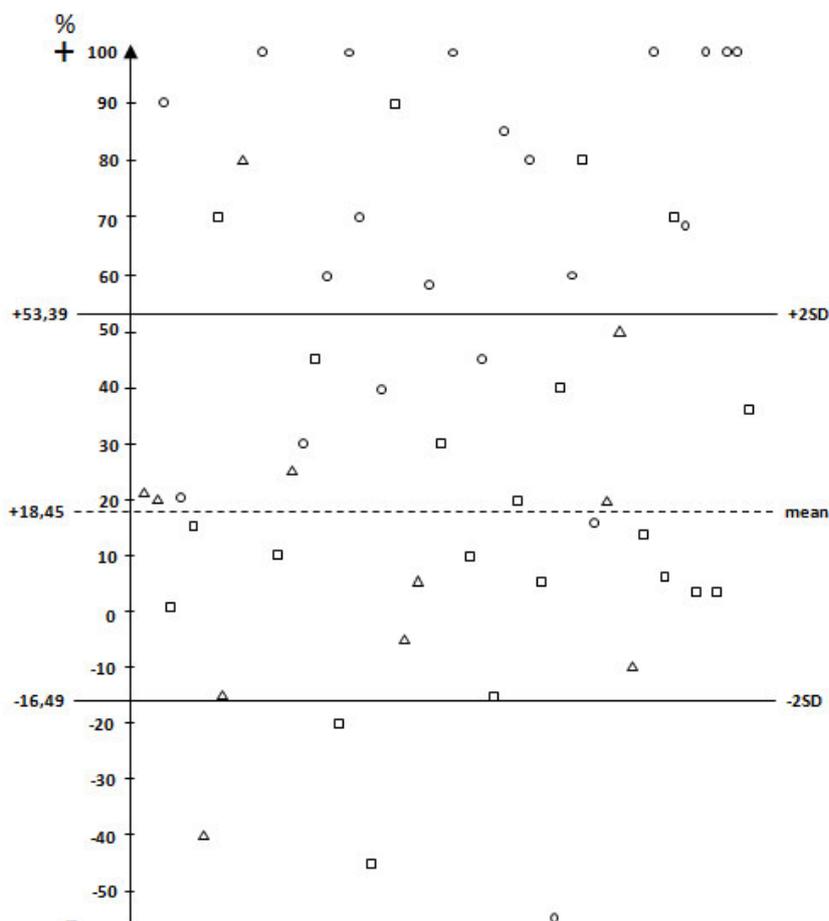


Abbildung 9. Bland-Altman-Plot⁸⁰ für Prozent spezifisch positive membranöse Epithelzellularfärbung. Hier werden die Unterschiede der Färbeergebnisse zwischen der Paraffin- und der Kryohistologie (je mit Klon 4B5) dargestellt (53 von 65 untersuchten Gewebeproben waren verschieden, entspricht 81,5%). SD bezeichnet die Standardabweichung, mean den Durchschnitt. Kreise symbolisieren Mukosaschnitte, Rechtecke Primärtumore und Dreiecke Lebermetastasen.

Ergebnisse

Wie bereits mit dem Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten nachgewiesen, besteht keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Färbeverfahren. Dies kann zudem mit dem Vergleich der Prozentzahlen HER2/neu-positiver Epithelzellen beider Kollektive anhand des Student-t-Test unterstrichen werden: statistisch besteht eine signifikante Differenz zwischen den Prozentzahlen positiver Epithelzellen der Kryo- und Paraffinhistologie im Mukosagewebe ($p=2,69 \times 10^{-7}$) und den Primärtumore ($p=0,008$), jedoch nicht signifikant bei den Lebermetastasen ($p=0,189$). Des Weiteren besteht keine signifikante Korrelation zwischen den HER2/neu-Nachweishäufigkeiten in allen drei Geweben (**Tabelle 19**).

Mukosae (n=21)		Paraffin		p-Wert
		negativ	positiv	
Kryo	negativ	0	17	1,000
	positiv	0	4	
Primärtumore (n=27)		Paraffin		p-Wert
		negativ	positiv	
Kryo	negativ	5	10	0,181
	positiv	1	11	
Lebermetastasen (n=17)		Paraffin		p-Wert
		negativ	positiv	
Kryo	negativ	4	4	0,335
	positiv	2	7	

Tabelle 19. Vergleich der spezifischen Färbeergebnisse von Kryo- und Paraffinhistologie (mit dem Klon 4B5) und die Korrelation gerechnet mit dem exakten zweiseitigen Fisher-t-Test.

3.2.3. Vergleich Immunhistochemie (IHC) mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Stichprobenartig wurden von komplett negativen (Score 0) bis stark positiven Fälle (Score 3+) in der Kryo- und Paraffinimmunhistologie (Klon 4B5) mittels der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf HER2/neu-Genamplifikation untersucht (insgesamt n=27, **Tabelle 20**, siehe unten). Alle untersuchten Patienten, sogar zwei stark positiven (Score 3+ in der Kryo- oder Paraffinhistologie) und drei weiteren Score 2+ malignen Gewebeproben, zeigten keine nennenswerte Genamplifikation, weder nach Mamma- noch nach Magenkarzinomkriterien (Quotient <1.8, siehe Einleitung: **Tabelle 1**, Seite 4). In 20 von 27 Geweben waren FISH und die Kryohistologie negativ (=74,1%). In nur vier von 27 Fällen (=14,8%) konnte ein geringer Quotient festgestellt werden (Fälle in **Tabelle 21** aufgeführt, siehe unten). In keinem Fall wurde eine Polysomie (sprich > 6 HER2/neu-Genkopien in 20 gezählten Zellen) entdeckt.

Ergebnisse

HER2-Status	IHC		Score 0	Score 1+	Score 2+	Score 3+
	FISH					
Mucosae (n=14)	negativ		12	1	1	0
	positiv		0	0	0	0
Primärtumore (n=9)	negativ		6	1	1	1
	positiv		0	0	0	0
Lebermetastasen (n=4)	negativ		2	0	1	1
	positiv		0	0	0	0

Tabelle 20. Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und 4B5-Kryomikroimmunhistologie (IHC) unterteilt in positiv/negativ in allen drei Gewebearten.

Gewebe	Fallnummer	FISH-Quotient	Kryohistologie		Paraffinhistologie	
			%	Score	%	Score
Mucosae	4188	1,7	0	0	85	2+
Primärtumore	4156	1,36	0	0	90	2+
Lebermetastasen	3989	1,09	20	2+	40	2+
	4047	1,44	0	0	80	2+

Tabelle 21. Detail der vier Fälle mit positivem FISH-Quotienten (HER2/CEP17-Verhältnis), jedoch alle unterhalb des Mindestwertes von 1,8. Alle anderen FISH-Untersuchungen zeigten einen Quotienten von 0. Zum Vergleich, die Ergebnisse der Kryo- und Paraffinimmunhistologie mit dem Klon 4B5 (% bedeutet Prozentzahl spezifisch positiver Zellen).

Bei komplett negativen Ergebnissen seitens der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) entfällt eine Korrelation zwischen den Histologie- und den FISH-Daten.

3.3. HER2/neu beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom

3.3.1. HER2/neu-Expression in benigner tumorferner Kolonmukosa

Von den 89 mit dem Klon 4B5 kryohistologisch untersuchten gutartigen tumorfernen Dickdarmschleimhäuten waren 12 spezifisch HER2/neu-positiv (=13,5%): alle wiesen eine basolaterale oder laterale membranöse Färbung auf, drei davon sogar zusätzlich eine komplette Membranfärbung. Die Streubreite spezifisch positiv bestimmter Epithelzellen im einzelnen Präparat ging von 2 bis 80%, der Mittelwert bei 19,2%. Die meisten positiven Proben wurden mit Score 2+ (8 von 12, =66,7%) und jeweils nur 2 Proben mit Score 1+ und 3+ (je 16,7%) bewertet.

Eine unspezifische Zellfärbung wurde ebenso dokumentiert: die unzureichende, ausschließlich basale oder luminale Membranfärbung wurde nicht beobachtet, dafür aber eine zytoplasmatische Färbung in 15 von 89 Proben (=16,9%). Am stärksten fiel eine unspezifische Muzinanfärbung in den Krypten und an der Zelloberfläche auf (61 von 89,

=68,5%), gefolgt von einer körnigen (granulären) Färbung der Epithelzellen (29 von 89, =32,6%). Eine nukleäre Anfärbung konnte in keinem Fall beobachtet werden.

In zwei der 12 positiven Fällen war ein heterogener Score im Gewebe beschrieben worden. Maßgeblich für das Ergebnis war jedoch immer der stärkere Score. **Tabelle 24** und **Tabelle 25** im Abschnitt 3.3.4. (Seite 46) fassen die gesamten Ergebnisse des mit dem Klon 4B5 in der Kryoimmunhistologie untersuchten Gesamtkollektivs zusammen.

In allen untersuchten Schleimhautpräparaten war die spezifische membranöse HER2/neu-Färbung in den untersten Kryptenkompartimenten⁷⁸ (1 bis 3) lokalisiert. Nur in einem Fall konnte eine zusätzliche Positivität der oberen luminalen Kryptenzellen beobachtet werden. Im Gegenteil waren die luminalen Mukosazellen eher mit einer unspezifischen granulären Färbung belegt (29 von 89 beobachteten Fällen, =32,6%).

3.3.2. HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom

Die Untersuchungen der kolorektalen Primärtumore (Kryoimmunhistologie, Klon 4B5) zeigten einen hohen Prozentsatz von 43,8% an spezifischer HER2/neu-Tumorepithelfärbung (39 von 89 Fälle), davon über die Hälfte mit Score 2+ (22 von 39, =56,4%) sowie ein Drittel der positiven Proben mit Score 3+ (13 von 39, =33,3%). Nur vier zeigten eine geringe Expression mit Score 1+ (=10,3%). Auch unter den Primärtumoren hatten alle spezifisch positiven Fälle eine basolaterale oder laterale sowie 7 von 39 (=17,9%) zusätzlich eine komplette Membranfärbung aufzuweisen. Der Mittelwert spezifisch positiver Epithelzellen im Gewebepräparat lag bei 16,6% (etwas geringer als bei der gutartigen Mukosa), die Streubreite zwischen 1 und 85%.

Die unspezifische Färbung war in 61,8% der Schnitte vorhanden, überwiegend in granulärer Form (55 von 89, =61,8%). Des Weiteren fand sich eine zytoplasmatische Färbung in 34 von 89 Fällen (=38,2%) wieder, eine muzinöse in 32 von 89 (=36,0%). Die Zellkerne zeigten sich nie gefärbt. **Tabelle 24** und **Tabelle 25** im Abschnitt 3.3.4. (Seite 46) fassen die gesamten Ergebnisse des mit dem Klon 4B5 in der Kryoimmunhistologie untersuchten Gesamtkollektivs zusammen.

In 16 der 39 HER2/neu-positiven Tumoren (=41,0%) wurde eine heterogene Färbeintensität mit unterschiedlichen Anteilen an schwacher, mäßiger und starker spezifischer Färbung gesehen, wobei wiederum immer der stärkste Score maßgeblich war.

An der Tumorinvasionsfront sowie an nekrotischen Arealen angrenzende Karzinomzellen zeigten kein anderes Färbemuster als im Tumorzentrum. Von 16 auf den Gewebeschnitten mituntersuchten tumornahen Mukosaareale, zeigte nur in einem Fall die Schleimhaut eine starke spezifische Membranfärbung der basalen Kryptenzellen. Die anderen Fälle zeigten ein aus der tumorfernen Schleimhaut bekanntes unspezifisches muzinöses und granuläres Färbemuster.

Im Vergleich mit der tumorfernen benignen Mukosa, wies das Färbemuster der Primärtumore einen höheren Anteil an unspezifischer zytoplasmatischer und granulären Färbung auf, sowie einen deutlich geringeren Anteil an muzinöser Anfärbung.

3.3.3. HER2/neu-Expression in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome

Von 58 in der Kryoimmunhistologie (Klon 4B5) untersuchten kolorektalen Lebermetastasen zeigten 24 (=41,4%) eine spezifische HER2/neu-Membranfärbung. Auch bei diesem Gewebetyp zeigten alle Präparate vorwiegend eine basolaterale oder laterale und selten (3 von 24, =12,5%) eine komplette spezifische Membranfärbung. Unter den positiven Metastasen waren eine mit Score 1+ (=4,2%), 11 mit 2+ (45,8%) und 12 mit Score 3+ (50,0%). Der Mittelwert an spezifisch positiven Epithelzellen im jeweiligen Präparat lag wie beim Primärtumor eher gering bei 16,6%, die Streubreite von 2 bis 100%.

Eine unspezifische Zellfärbung zeigte sich mit einer unzureichenden isoliert basalen oder luminalen Membranfärbung in 3 von 58 Lebermetastasen (=5,2%), einer zytoplasmatischen in 17 (=29,3%), einer granulären in 32 (=55,2%) und einer muzinösen Färbung in 10 Fällen (=17,2%). Eine nukleäre Färbung bestand nie. **Tabelle 24** und **Tabelle 25** im Abschnitt 3.3.4. (Seite 46) fassen die gesamten Ergebnisse des mit dem Klon 4B5 in der Kryoimmunhistologie untersuchten Gesamtkollektivs zusammen.

13 der 24 spezifisch HER2/neu-positiven Lebermetastasen (54,2%) wiesen einen heterogenen Farbe-Score auf. Auf jedem Objektträger konnte die Tumorinvasionsfront der Lebermetastase ebenfalls untersucht werden. Bei einem Präparat konnte eine stärkere membranöse Farbeintensität in den hepatischen Invasionszellen im Vergleich zum Metastasenzentrum beobachtet werden, in einem weiteren Fall konnte im Invasionsbereich eine heterogene HER2/neu-Färbung beobachtet werden. Bei einer Lebermetastase zeigte sich das Tumorrandgebiet zu einem Nekroseareal stärker gefärbt als das Tumorzentrum.

Ergebnisse

Ansonsten verhielten sich Tumorinvasionsfront und Nekrose-angrenzende Metastasenzellen gleichermaßen wie zentral gelegene.

Das Kollektiv beinhaltet sowohl Patienten mit als auch ohne vorbehandelten kolorektalen Primärtumor im Sinne einer stattgehabten adjuvanten Chemotherapie (neoadjuvante Therapien der Lebermetastasen wurden ausgeschlossen, siehe Ein- und Ausschlusskriterien in Material und Methoden: Abschnitt 2.1.1., Seite 11). Die untersuchten Lebermetastasen wurden daher nach Aktenlage unterteilt in unbehandelt und vorbehandelt (zwei Fälle waren nicht eruierbar, daher n=56). Lebermetastasen vorbehandelter Patienten zeigten einen geringeren Anteil (=37,2%) spezifischer HER2/neu-Expression als die unbehandelten Patienten (=53,8%), der Median der Prozentzahl positiver Karzinomzellen war in beiden Gruppen ähnlich (14,3% versus 17,6%; kein statistischer Unterschied, p=0,83). Das Scoring war mit naheliegenden Anteilen an Score 2+ und 3+ Fällen in beiden Gruppen vergleichbar (kein statistischer Unterschied, p=0,32) mit leichter Tendenz zum höheren Score 3+ bei den vorbehandelten Patienten (Score 2+: 57,1% vs. 43,8%; Score 3+: 42,9% vs. 50%). Ein Unterschied des Färbemusters in den Lebermetastasen zwischen behandelte und nicht-behandelte Patienten konnte nicht beobachtet werden. **Tabelle 22** zeigt die erhobenen HER2/neu-Ergebnisse in beiden Gruppen.

Lebermetastasen	n	Spezifische Epithelzelloberfärbung der Lebermetastasen					
		Nachweis- häufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streubreite)	Score			
				0	1+	2+	3+
unbehandelt	13	7 (53,8%)	14,3% (2-60)	6	0 (0,0%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)
vorbehandelt	43	16 (37,2%)	17,6% (2-100)	27	1 (6,3%)	7 (43,8%)	8 (50,0%)

Tabelle 22. Unterteilung des Lebermetastasen-Kollektivs in unbehandelte und vorbehandelte Patienten (n=56). Nachweisfrequenz widerspiegelt die Anzahl an positiven Geweben (sowie Prozentsatz am Kollektiv n). Median gibt den Durchschnitt der Prozentzahlen an spezifisch positiven Epithelzellen an (sowie deren Streubreite). Unter Score steht die Anzahl und der Prozentsatz des jeweilig vergebenen Score am positiv befundenen Kollektiv (= Nachweisfrequenz) bzw. Score 0 bei negativ befundenen Präparat.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen HER2/neu-Status und vorausgegangener Therapie des Primärtumors kann nicht gesehen werden (**Tabelle 23**).

Ergebnisse

Lebermetastasen	n	HER2/neu-Expression in kolorektalen Lebermetastasen					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Vorausgegangene Chemotherapien [#]	56						
nein = unbehandelt		6	7	0,344	10	3	0,705
ja = vorbehandelt		27	16		35	8	

Tabelle 23. Korrelationen zwischen HER2/neu-Status der Lebermetastase und einer vorausgegangener Chemotherapie des Primärtumors. [#] Der Patient erhielt im Rahmen des Primärtumors eine adjuvante Chemotherapie.

3.3.4. Gegenüberstellung der spezifischen HER2/neu-Expressionen in allen drei Gewebearten

Die Ergebnisse der spezifischen und unspezifischen HER2/neu-Färbung mit dem Klon 4B5 mittels Kryohistologie in allen Gewebearten sind in den **Tabellen 24** und **25** (Seite 46) aufgeführt.

Stellt man die spezifische HER2/neu-Expression der drei Gewebearten gegenüber, so fällt eine Zunahme der HER2/neu-Nachweishäufigkeit von der gutartigen Mukosa zu den malignen Gewebearten (sowohl Primärtumor als auch Lebermetastase) auf (13,5% vs. etwa 42%). Der genauen patientenbezogenen Gegenüberstellung der HER2/neu-Expression in der autologen gutartigen tumorfernen Mukosa und dem kolorektalen Primärtumor ist nachfolgend ein eigener Abschnitt (3.3.5., Seite 48) gewidmet. Der Median spezifisch positiver Epithelzellen im Präparat war bei allen drei Gewebearten vergleichbar (19,2% vs. 16,6%), die Streubreite ebenso. In allen Gewebearten war die spezifische Membranfärbung als basolateral und/oder lateraler Morphologie erkennbar, die komplette membranöse Färbung war selten vorhanden. Bezüglich der Färbeintensität (Score) kann eine Verschiebung im Anteil Score 3+ befundeter Proben von der Mukosa zum Primärtumor (2,2% zu 14,6%) und von Primärtumor zur Lebermetastase (14,6% zu 20,7%) gesehen werden (nachgewiesener statistischer Unterschied siehe unten). Zusammenfassend zeigt **Abbildung 10** (Seite 46) alle untersuchten Gewebeproben und ihre dazugehörige spezifische HER2/neu-Expression mit Angabe der Prozentzahl des jeweiligen Anteils.

Bezüglich der unspezifischen Färbung, war ein muzinöse Reaktion in der Mukosa am höchsten und in den Lebermetastasen am geringsten (68,5% vs. 17,0%). Die zytoplasmatische und granuläre Färbung war eher in den malignen Geweben vorhanden als in der gutartigen Kolonmukosa.

Ergebnisse

Gewebe	n	Färbemuster der Epithelzellen						
		spezifisch membranös		nicht spezifisch				
		komplett membranös	basolateral/lateral membranös	basal/luminal membranös	zytoplasmatisch	nukleär	granulär	muzinös
Mukosae	89	3	12	0	15	0	29	61
Primärtumore	89	7	39	7	34	0	55	32
Lebermetastasen	58	3	24	3	17	0	32	10

Tabelle 24. Unterteilung des HER2/neu-Färbemusters am Gesamtkollektiv (n=89 bzw. n=58) mit Kryohistologie und dem Klon 4B5 (Arbeitskonzentration 1,5µg/ml) auf allen drei Gewebearten in spezifisch membranös und nicht spezifisch.

Gewebe	n	Spezifische Epithelzellularfärbung					
		Nachweishäufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streuung)	Score			
				0	1+	2+	3+
Mukosae	89	12 (13,5%)	19,2% (2-80)	77	2 (16,7%)	8 (66,7%)	2 (16,7%)
Tumore	89	39 (43,8%)	16,6% (1-85)	50	4 (10,3%)	22 (56,4%)	13 (33,3%)
Metastasen	58	24 (41,4%)	16,6% (2-100)	34	1 (4,2%)	11 (45,8%)	12 (50,0%)

Tabelle 25. Ergebnisse der spezifischen HER2/neu-Expression mit dem Klon 4B5 am Gesamtkollektiv. Nachweishäufigkeit widerspiegelt die Anzahl an positiven Geweben (sowie Prozentsatz des Gesamtkollektivs n). Median gibt den Durchschnitt der Prozentzahlen an spezifisch positiven Epithelzellen an (sowie deren Streubreite). Unter Score steht die Anzahl und der Prozentsatz des jeweilig vergebenen Score am positiv befundenen Kollektiv (= Nachweishäufigkeit) bzw. Score 0 bei negativem Präparat oder unspezifischer Färbung.

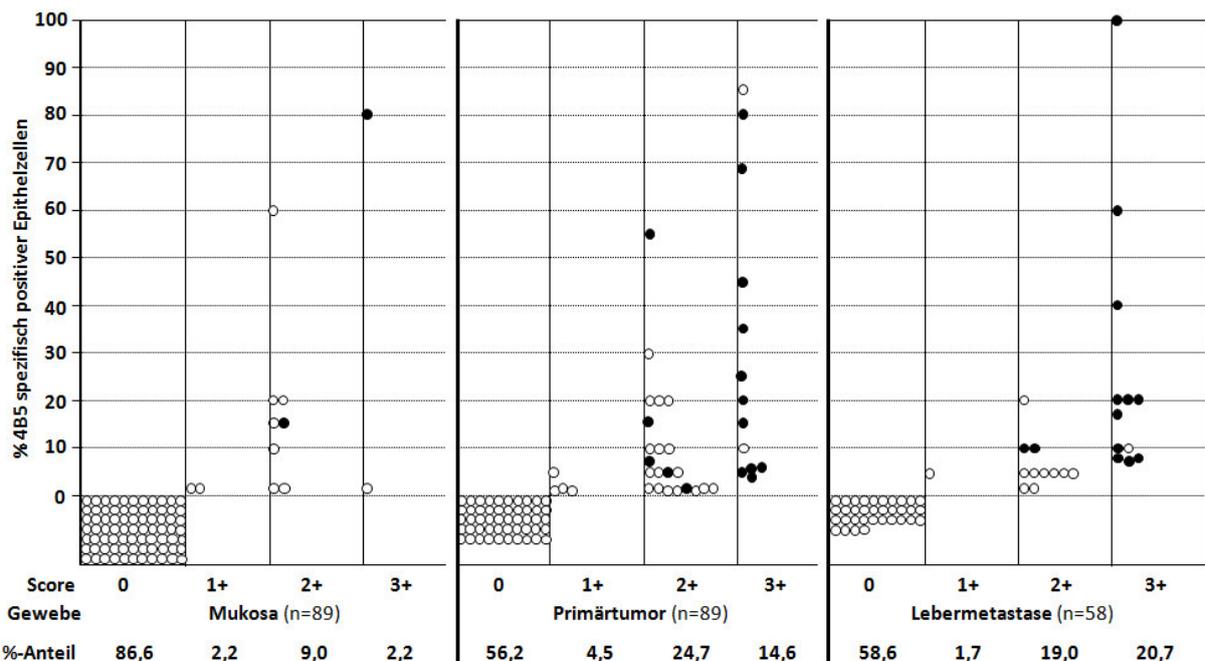


Abbildung 10. HER2/neu-Expressionsprofil anhand des 4B5-Antikörpers für alle drei Gewebearten. Score in der Abszisse und prozentualer Anteil in der Ordinate. Jeder Punkt steht für einen Fall; gefüllte Punkte symbolisieren eine heterogene Färbintensität (Score) in diesem Gewebe, wobei der stärkste aufgezeichnet wurde. Die unterste Zeile widerspiegelt den Prozentanteil an Fällen des jeweiligen Score des jeweiligen Gewebes.

Ergebnisse

Die Verteilung der HER2/neu-spezifischen Ergebnisse im Primärtumor (n=89) und den Lebermetastasen (n=58) wurde mit dem Student-t-Test verglichen. Dabei zeigte sich der Anteil HER2/neu-positiver Epithelzellen beider Gewebeprobe gleichverteilt (kein statistischer Unterschied nachgewiesen, $p=0,892$), die Verteilung der Score jedoch hochsignifikant unterschiedlich ($p=1,21 \times 10^{-5}$).

Lässt man die erhobenen Ergebnisse der HER2/neu-Expression durch die strengen Raster der Mamma- oder Magenkarzinomrichtlinien so fallen einige positiv befundeten Proben heraus beziehungsweise wäre nach Brustkrebskriterien kein einziges Präparat als positiv zu werten, da die seltenen Fälle einer spezifischen kompletten Membranfärbung (13 von 236 Proben, =5,5%, siehe **Tabelle 24**, Seite 46) nur eine geringe Prozentzahl erwiesen (alle geringer als 10%, siehe Kriterien in der Einleitung: **Tabelle 1**, Seite 4).

Dem Magenkarzinom angepassten Kriterien⁴² zufolge, wären jedoch jeweils gut 20% der malignen Gewebe HER2/neu-positiv zu werten und davon alle mit einem potentiellen Trastuzumab-indikationsstellenden Score 3+ bei der Hälfte aller positiv gewerteten Primärtumore und sogar bei drei Viertel der positiven Lebermetastasen; die übrigen Fälle mit Score 2+. Durch den Stichwert (Cut-off von $\geq 10\%$ positiver Zellen) erhöht sich der Mittelwert der positiven Zellen auf den Präparaten (**Tabelle 26**).

Gewebe	n	HER2/neu-Expression nach Magenkarzinomrichtlinien					
		Nachweis- häufigkeit	Median Prozent positiver Zellen (Streubreite)	Score			
				0	1+	2+	3+
Mukosae	89	7 (7,9%)	31,4% (10-80)	82	0 (0%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)
Tumore	89	18 (20,2%)	31,9% (10-85)	71	0 (0%)	9 (50,0%)	9 (50,0%)
Metastasen	58	12 (20,7%)	28,1% (10-100)	46	0 (0%)	3 (25,0%)	9 (75,0%)

Tabelle 26. Ergebnisse der HER2/neu-Expression mit dem Klon 4B5 nach Magenkarzinomrichtlinien⁴². Dabei wurde der Cut-off von $\geq 10\%$ positiver Tumorzellen berücksichtigt (siehe **Tabelle 1**, Seite 4). Nachweishäufigkeit widerspiegelt die Anzahl an positiv gewerteten Geweben (sowie Prozentsatz des Gesamtkollektivs n). Median gibt den Durchschnitt der Prozentzahlen an spezifisch positiven Epithelzellen an (sowie deren Streubreite). Unter Score steht die Anzahl und der Prozentsatz des jeweilig vergebenen Score am positiv befundeten Kollektiv (= Nachweishäufigkeit) bzw. Score 0 bei negativem Präparat, unspezifischer Färbung oder $< 10\%$ spezifisch positiver Tumorzellen.

3.3.5. HER2/neu-Expression in primären kolorektalen Karzinomen und autologer benigner Kolonmukosa

Untersucht wurde in allen 89 Fällen, neben dem primären kolorektalen Karzinom, auch die HER2/neu-Expression der tumorfernen gutartigen Kolonschleimhaut (autologen Mukosa) (siehe 3.3.1., Seite 41). Zwölf von 89 Mukosaproben (=13,5%) zeigten eine positive HER2/neu-Färbung, davon 5 (von 12, =41,7%) sogar eine höhere Expression als der untersuchte autologe Primärtumor: bei zwei der 5 Patienten bestand nur ein sehr geringer Unterschied von wenigen Prozenten bei einem schwachen Score von 1+, bei den übrigen drei Patienten war der prozentuelle Anteil positiver Zellen geringer im Primärtumor bei gleichem Score, außer bei einem Gewebe mit einem höherem Score im Tumor als der Mukosa. Sechs der 12 positiv befundeten Mukosae zeigten eine Zunahme des prozentualen Anteils, darunter drei zusätzlich auch im Scoring.

Rund 53% verhielten sich gleich und zeigten keine HER2/neu-Färbung weder im Primärtumor noch in der Mukosa. Nur ein Patient zeigte eine identische Prozentzahl und Score (20%, 2+) in beiden Gewebearten.

In 36 der 89 Fällen (=40,4%) war eine Zunahme der HER2/neu-Expression von der Mukosa zum Primärtumor zu beobachten, wovon 30 gutartige Mukosae negativ waren (=33,7%).

Tabelle 27 fasst die Unterschiede in Anzahl und Prozentzahl zusammen, **Abbildung 11** zeigt zwei Grafiken mit Prozentzahl bzw. Score des Primärtumor auf der Abszisse und den korrespondierenden Werte der autologen Mukosa auf der Ordinate. Dabei wird die Verschiebung mit Zunahme der HER2/neu-Expression im Primärtumor ersichtlich.

Prozentualer Anteil spezifisch HER2/neu-positiver Epithelzellen	Anzahl der Fälle	Prozentzahl der Fälle
gleichwertig in Mukosa und Primärtumor *	48	53,9 %
Mukosa < Primärtumor	36	40,4 %
Mukosa > Primärtumor	5	5,6 %

Tabelle 27. Unterschiede zwischen Primärtumor und autologer Mukosa nach dem prozentualen Anteil spezifisch positiver Epithelzellen. * Alle negativ außer einem Fall. Ergebnisse basieren auf Kryohistologie des Gesamtkollektivs (n= 89) mit dem Klon 4B5.

Ergebnisse

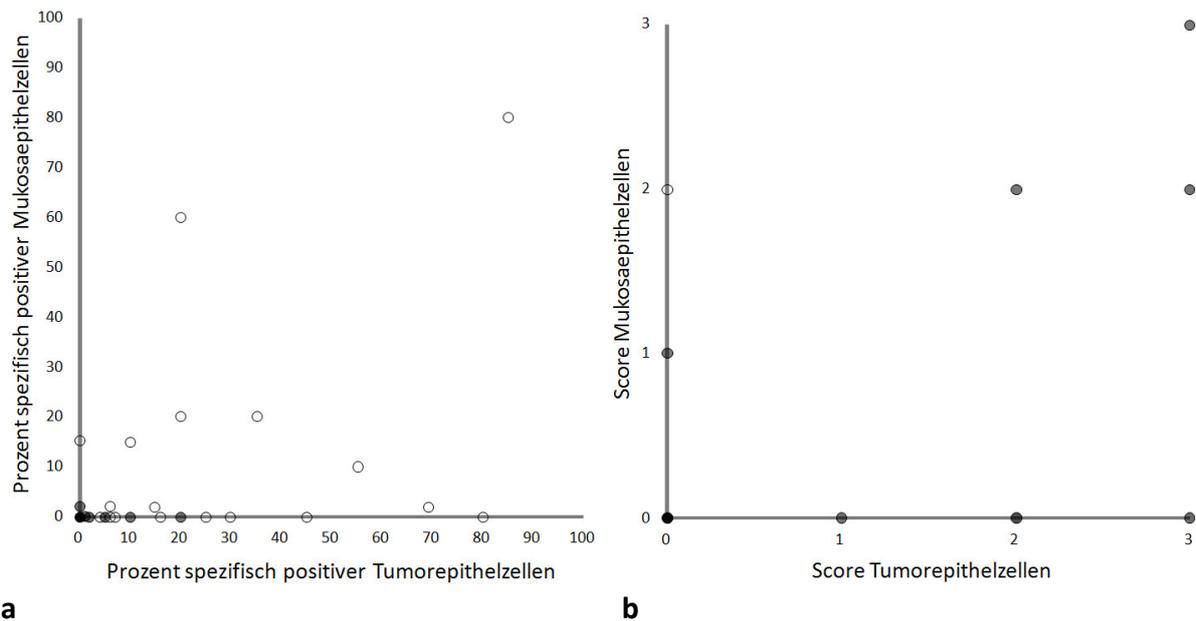


Abbildung 11. Vergleich der HER2/neu-Expression auf dem Primärtumor mit der autologen gutartigen Mukosa. Grafik **a** zeigt den prozentualen Anteil spezifisch positiver Epithelzellen von Primärtumor auf der Abszisse und der autologen Mukosa auf der Ordinate, Grafik **b** respektive den Score. Farbtönung der Punkte widerspiegelt die Anzahl der Fälle.

Statistisch gesehen unterscheiden sich der Prozentsatz HER2/neu-positiver Zellen sowie die Scores zwischen der autologen Mukosa und dem Primärtumor signifikanter Maßen ($p=0,003$ und $p=3,99 \times 10^{-8}$ im abhängigen t-Test bzw. Paardifferenzentest).

Untersucht wurde zudem der Zusammenhang zwischen einem HER2/neu-Nachweis in der gutartigen tumorfernen Kolonschleimhaut und dem entsprechenden kolorektalen Karzinom. Dabei zeigen sich statistisch signifikante Korrelationen beim Anteil positiver Zellen ($p=0,028$) sowie beim Score ($p=0,002$): ein positiver Tumor besitzt am ehesten eine bereits positive Mukosa (9 von 12, =75% versus nur 30 von 77 positiver Tumore mit negativer Mukosa, =39,0%) und ein hoher Score im Primärtumor besteht bei positiver Mukosa eher als bei negativer Schleimhaut (6 von 12, =50% versus 7 von 77, =9,1%). Zudem besteht ein statischer Zusammenhang zwischen den Scores beider Gewebearten ($p = 0,020$): wie bereits oben statistisch bewiesen sind sich die Scores von autologer Mukosa und zugehörigem Primärtumor ähnlich (76 von 87 Fälle haben in beiden Geweben einen geringen Score, =87,4%, wobei hohe Scores jeweils in beiden Gewebearten bestanden, 2 von 2 =100%).

Tabelle 28 zeigt die Fallzahlen und p-Werte des exakten Fisher-Testes.

Ergebnisse

HER2/neu-Expression in der Mukosa	n	HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
4B5-Expression	89						
negativ		47	30	0,028	70	7	0,002
positiv		3	9		6	6	
Score	89						
0/1+/2+		50	37	0,189	76	11	0,020
3+		0	2		0	2	

Tabelle 28. Korrelationen zwischen mit dem Klon 4B5 erhobene HER2/neu-Expression und Score aus autologer benigner tumorfernen Kolonmukosa und kolorektalen Primärtumoren. Signifikante p-Werte sind **fett** markiert.

3.3.6. HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom und autologer synchroner Lebermetastase

Von vier Patienten konnten der Primärtumor sowie die dazugehörige Lebermetastase untersucht werden (synchrone autologe Lebermetastase). Diese vier Fälle sind in **Tabelle 29** mit den erhobenen Werten in der Kryohistologie (Klon 4B5) dargestellt.

Drei der vier Fälle zeigten identische Werte zwischen den beiden malignen Geweben, lediglich bei einem Patienten ist ein leichter Unterschied zu erkennen: die Lebermetastase wies keine HER2/neu-Expression auf wobei der Primärtumor einen geringen Anteil mäßig positiver Epithelzellen enthielt (5%, Score 2+). Alle vier Patienten hatten eine negative tumorferne Mukosa.

Fall-nummer	Mukosa	Primärtumor		Lebermetastase	
		%	Score	%	Score
4188	negativ	10	3+	10	3+
4216	negativ	0	0	0	0
4230	negativ	2	2+	2	2+
4448	negativ	5	2+	0	0

Tabelle 29. Vier Fälle bei denen alle drei Gewebearten aus einem Patienten untersucht werden konnten. % bedeutet den Prozentsatz spezifisch positiver Epithelzellen im Präparat. Ergebnisse basieren auf Kryohistologie mit dem Klon 4B5.

3.3.7. Korrelation der HER2/neu-Expression mit klinisch-pathologischen Daten

Die Ergebnisse der HER2/neu-Färbung (Kryohistologie mit dem Klon 4B5) wurden mit klinischen und pathologischen Faktoren der Patienten korreliert.

Es bestehen statistisch signifikante Korrelationen zwischen der spezifischen membranösen HER2/neu-Expression in kolorektalen Primärtumorzellen einerseits mit dem Geschlecht und andererseits mit der Tumorlokalisation.

Ein HER2/neu-positiver kolorektaler Tumor wurde bevorzugt beim weiblichen Geschlecht gefunden: 24 von 39 positiven Tumoren waren von weiblichen Patienten (=61,5%) wobei nur 15 von 50 (=7,5%) dem männlichen Geschlecht zugeordnet wurden ($p=0,005$). Entsprechend zeigt sich eine Korrelation zwischen einem hohem Score und dem weiblichen Geschlecht (10 von 39, =25,6% versus 3 von 50, =6% hohe Scores bei den männlichen Tumoren, $p=0,014$).

Bezüglich der Tumorlokalisation waren am ehesten linksseitig lokalisierte Tumore (Colon descendens, Sigma oder Rektum > 12cm ab ano) HER2/neu-positiv: 26 von 47 (=55,3%) linksgelegenen Tumore waren HER2/neu-positiv im Gegensatz zu 13 von 42 rechtsseitigen Karzinomen (=31,0%) ($p=0,032$). Beim Score ist die Diskrepanz deutlicher, mit 12 von 47 links eingestuft Tumore (=25,5%) gegenüber nur 1 von 42 rechtsbetonten Malignomen (=2,4%) ($p=0,002$).

Ansonsten bestanden keine weiteren signifikanten Korrelationen mit Alter, Tumorgroße und anderen pathologischen Tumorkriterien. **Tabelle 30** zeigt die Korrelationen der spezifischen membranösen HER2/neu-Expression in Primärtumorzellen mit den klinisch-pathologischen Patientendaten.

Ergebnisse

Faktoren	n	HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Geschlecht	89						
Männlich		35	15	0,005	47	3	0,014
Weiblich		15	24		29	10	
Alter	89						
≤68,1 Jahre		20	19	0,519	31	8	0,228
>68,1 Jahre		30	20		45	5	
Tumorlokalisation*	89						
rechts		29	13	0,032	41	1	0,002
links		21	26		35	12	
Tumorgröße	89						
≤4,7 cm		25	25	0,203	42	8	0,768
>4,7 cm		25	14		34	5	
Histologischer Tumortyp	89						
Adenokarzinom		40	36	0,135	64	12	0,682
Muzinöses Adenokarzinom		10	3		12	1	
Grading	89						
G1-2		31	26	0,664	48	9	0,763
G3-4		19	13		28	4	
Tumorstatus	89						
pT1-2		11	5	0,405	15	1	0,449
pT3-4		39	34		61	12	
Lymphknotenstatus	89						
negativ (pN0)		33	24	0,824	52	5	0,059
positiv (pN1-2)		17	15		24	8	
Metastasenstatus	89						
negativ (cM0)		43	32	0,771	64	11	1,000
positiv (cM1)		7	7		12	2	
UICC-Klassifikation	89						
I-II		31	22	0,666	48	5	0,128
III-IV		19	17		28	8	
Lymphangiis carcinomatosa	55						
L0		21	16	0,774	31	6	1,000
L1		9	9		15	3	
Gefäßstatus	55						
V0		25	24	1,000	41	8	0,577
V1		3	3		6	0	
Perineurale Invasion	20						
Pn0		8	7	0,999	13	2	1,000
Pn1		2	3		4	1	
R-Klassifikation (Residual)	89						
R0		46	38	0,380	71	13	1,000
R1-2		4	1		6	1	

Tabelle 30. Korrelation der HER2/neu-Expression (anhand des Antikörper 4B5) im kolorektalen Primärtumor mit den klinisch-pathologischen Faktoren. * rechts = Caecum, Colon ascendens, Colon transversum; links = Colon descendens, Sigma, Rektum (> 12cm ab ano). Signifikante p-Werte sind **fett** markiert.

Tabelle 31 zeigt die Korrelationen der spezifische membranösen HER2/neu-Expression auf Epithelzellen der kolorektalen Lebermetastasen mit den klinisch-pathologischen Daten. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen gesehen werden, eine Wiederholung der Korrelation wie beim Primärtumor mit dem Geschlecht zeigte sich nicht.

Ergebnisse

Faktoren	n	HER2/neu-Expression in Lebermetastasen					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Geschlecht	58						
Männlich		20	17	0,413	39	8	1,000
Weiblich		14	7		17	4	
Alter	58						
≤62,6 Jahre		14	10	1,000	20	4	0,744
>62,6 Jahre		20	14		26	8	
Tumorgröße	56						
≤3,93 cm		21	14	1,000	28	16	0,748
>3,93 cm		12	9		7	5	
Anzahl an Lebermetastasen	55						
1-2		21	15	1,000	30	6	0,303
≥ 3		11	8		13	6	
Histologischer Tumortyp	57						
Adenokarzinom		29	22	1,000	39	12	0,325
Muzinöses Adenokarzinom		4	2		6	0	
Grading	54						
G1-2		20	15	1,000	29	6	0,489
G3-4		11	8		14	5	
R-Klassifikation (Residual)	55						
R0		27	20	0,454	36	11	0,188
R1-2		6	2		8	0	

Tabelle 31. Korrelation der HER2/neu-Expression (Klon 4B5) in den Lebermetastasen mit den klinisch-pathologischen Faktoren.

3.3.8. Korrelation der HER2/neu-Expression mit weiteren Biomarker

Untersucht wurde der Zusammenhang der HER2/neu-Expression anhand der 4B5-Färbdaten der Kryohistologie mit weiteren Biomarkern in der gesunden Mukosa, den kolorektalen Primärtumoren sowie Lebermetastasen.

Statistisch signifikant erweist sich der Zusammenhang zwischen Zellproliferation (Ki67-Nachweis) und HER2/neu-Positivität in den mukösen Kryptenzellen ($p=0,010$). Während in 4 von 8 Proben (=50%) ein erhöhter Ki67-Labeling-Index mit einer HER2/neu-Positivität einherging, waren nur 8 von 81 (=9,9%) nicht stark proliferierenden Schleimhäute (Ki67-Labeling-Index $\leq 30\%$) HER2/neu-positiv.

Zudem besteht eine signifikante Korrelation zwischen Leukozyteninfiltration des Mukosabindgewebes und der HER2/neu-Expression ($p=0,029$): bei 9 von 39 (=23,1%) HER2/neu-positiven Proben konnte statistisch eine vermehrte (mäßig bis starke) Infiltration CD45-positiver Leukozyten gesehen werden im Vergleich zu 3 von 49 (=6,1%) positive Gewebe ohne Infiltration.

Andere Zusammenhänge insbesondere mit dem EGFR (HER1) zeigten sich statistisch nicht.

Tabelle 32 zeigt die Korrelationsdaten der benignen tumorfernen Mukosa.

Ergebnisse

Marker	n	HER2/neu-Expression in der benignen tumorfernen Kolonmukosa					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Ki67 Labeling-Index	89						
≤ 30%		73	8	0,010	80	1	0,173
> 30%		4	4		7	1	
CD45 positive Leukozyten im Bindegewebe	89						
keine bis vereinzelt		46	3	0,029	49	0	0,194
mäßig bis stark		30	9		37	2	
HLA-DR	89						
negativ		60	9	1,000	67	2	1,000
positiv		17	3		20	0	
EGFR	89						
≤ 70%		19	2	0,724	21	0	1,000
> 70%		58	10		66	2	

Tabelle 32. Korrelationen von HER2/neu-Expression (erhoben mit Klon 4B5) in der tumorfernen gesunden Mukosa mit verschiedenen Biomarkern. Signifikante p-Werte sind **fett** markiert.

Statistisch signifikant erwies sich im Primärtumor die Korrelation von Infiltration mit CD45-positiven Zellen und dem HER2/neu-Score ($p=0,037$): eine Infiltration ging in nur 2 von 38 Fällen mit einer HER2/neu-Positivität einher (=5,3%) im Gegensatz zu 11 von 51 (=21,6%) positiven Fällen ohne Infiltration CD45-positiver Zellen.

Karzinome mit geringer HLA-DR-Expression exprimierten vermehrt HER2/neu (24 von 40, =60%) gegenüber lediglich 15 von 49 HER2/neu-positiven und HLA-DR exprimierenden Tumore (=30,6%) ($p=0,010$). **Tabelle 33** weist die genauen Zahlen auf.

Marker	n	HER2/neu-Expression im primären kolorektalen Karzinom					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Ki67 Labeling-Index	89						
≤ 30%		23	11	0,124	30	4	0,759
> 30%		27	28		46	9	
CD45 positive Leukozyten im tumornahen Bindegewebe	89						
keine bis vereinzelt		25	26	0,135	40	11	0,037
mäßig bis stark		25	13		36	2	
HLA-DR	89						
negativ		16	24	0,010	31	9	0,073
positiv		34	15		45	4	
EGFR prozentualer Anteil	89						
≤ 50%		26	15	0,284	36	5	0,765
> 50%		24	24		40	8	
EGFR Färbeintensität	89						
negativ bis schwach		35	20	0,083	49	6	0,231
mäßig bis stark		15	19		27	7	

Tabelle 33. Korrelationen von HER2/neu-Expression (4B5-Klon) mit verschiedenen Biomarkern im kolorektalen Primärtumor. Signifikante p-Werte sind **fett** markiert.

Ergebnisse

Es wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen der HER2/neu-Expression und den untersuchten Biomarkern in kolorektalen Lebermetastasen gefunden. **Tabelle 34** zeigt die Fallzahlen und p-Werte der jeweiligen Paare.

Marker	n	HER2/neu-Expression in Lebermetastasen					
		negativ	positiv	p-Wert	Score 0/1+/2+	Score 3+	p-Wert
Ki67 Labeling-Index	58						
≤ 30%		15	5	0,094	18	2	0,187
> 30%		19	19		28	10	
CD45 positive Leukozyten im tumornahen Bindegewebe	58						
keine bis vereinzelt		25	9	0,759	35	9	1,000
mäßig bis stark		19	5		11	3	
HLA-DR	57						
negativ		24	15	0,565	33	6	0,165
positiv		9	9		12	6	
EGFR prozentualer Anteil	58						
≤ 50%		13	9	1,000	18	4	1,000
> 50%		21	15		28	8	
EGFR Färbeintensität	58						
negativ bis schwach		20	13	0,791	26	7	1,000
mäßig bis stark		14	11		20	5	

Tabelle 34. Korrelationen von HER2/neu-Expression (4B5-Klon) mit verschiedenen Biomarkern in kolorektalen Lebermetastasen.

4. DISKUSSION

4.1. Methodendiskussion

Die HER2/neu-Diagnostik zur Indikationsstellung einer Trastuzumab-Therapie ist für die Tumorentitäten Mamma- und Magenkarzinom mittlerweile klar festgelegt und unterscheidet sich in einigen Punkten maßgeblich (siehe Einleitung: Abschnitt 1.2., Seite 2). Durch die geringe Inzidenz an therapierelevanter HER2/neu-Überexpression in malignen Gewebearten ist eine sorgfältige Diagnostik notwendig. Zu Beginn unserer Studie stand die Methodenetablierung im Vordergrund, mit dem Ziel eine HER2/neu-Diagnostik für das primäre und hepatisch metastasierte kolorektalen Karzinom zu definieren.

4.1.1. Auswahl des HER2/neu-Antikörpers

Die HER2/neu-Expression auf benigner Kolonschleimhaut, kolorektalen Karzinomen sowie Lebermetastasen wurde anhand drei verschiedener HER2/neu-Antikörperklone (CB11, N12 und 4B5) immunhistologisch vergleichend untersucht. Interessanterweise kamen je nach Antikörper unterschiedliche Expressionsmuster heraus.

Mit dem Antikörperklon N12 konnte im Vergleich zu den anderen Klonen eine erheblich höhere unspezifische, nicht-epitheliale (insbesondere granuläre und muzinöse) sowie Hintergrundfärbung bei identischen Färbebedingungen festgestellt werden. Beide Arten der unspezifischen Färbung erschwerten die anspruchsvolle Auswertung sehr und stellen eine potentielle Fehlerquelle dar. Ein Erklärungsansatz für diesen Färbeunterschied zwischen den Klonen wären die Bindungsdomänen der Antikörper, wobei der Klon CB11 und 4B5 intrazellulär und der Klon N12 extrazellulär an den HER2-Rezeptor bindet^{72,73}. Damit wäre der Klon N12 für extrazellulär gelegener Zelldetritus oder Muzin und somit vorhandenen Molekülen wie makromolekulare Glykoproteine anfälliger als die intrazellulär bindenden HER2/neu-Antikörper und somit vermehrt unspezifisch binden. Dies könnte insbesondere durch die bis zu 18% höhere (CB11 4% und 4B5 7,7% versus N12 22%) HER2/neu-Nachweishäufigkeit im benignen und muzinabsondernden Mukosagewebe belegt werden, wobei die Prozentzahlen positiver Epithelzellen in den malignen Geweben ansonsten vergleichbar waren (mit Ausnahme einer höheren Fallzahl positiver Fälle mit dem Klon 4B5, siehe unten). Mit dem Klon N12 konnte, im Gegensatz zum Klon CB11, in einigen Fällen in jedem Gewebetyp eine epitheliale komplette Membranfärbung beobachtet werden, zudem

waren die vergebenen HER2/neu-Scores höher. Sollte dies ebenfalls mit der extrazellulären Bindungsdomäne und makromolekulare Glykoproteine des Muzins in Zusammenhang gestellt werden, so widerspricht die Tatsache, dass auch mit dem intrazellulär bindenden Antikörper 4B5⁷⁴ eine zirkuläre HER2/neu-Färbung und höhere Scores beobachtet werden konnten.

Mit dem Klon 4B5 ist die unspezifische, nicht-epitheliale Färbung wie bereits erwähnt im Vergleich zum Klon CB11 höher, jedoch geringer als auf den mit dem Antikörper N12 gefärbten Präparaten. Insgesamt besteht mit dem Klon 4B5 eine höhere Nachweishäufigkeit von HER2/neu in den kolorektalen Tumoren als mit den zwei anderen untersuchten Klonen (4B5: 51,3%, N12: 22% und Gesamtkollektiv CB11: 11,2%); im direkten Vergleich zwischen den zwei intrazellulär bindenden Antikörper, zeigten die mit dem Klon 4B5 inkubierten Gewebeproben jeweils einen etwas höheren Anteil spezifisch positiver Epithelzellen. Von den mit den zwei Klonen CB11 und 4B5 verschiedenen bewerteten Proben (29 von 98, 29,6%) des gesamten Untersuchungsgutes, lagen die Werte mit Ausnahme von vier (von 29, 13,8%) Ausreißern immer innerhalb der doppelten Standardabweichung (siehe Ergebnisse: **Abbildung 6**, Seite 33). Mit dem Klon 4B5 wurden allerdings im Vergleich zum Klon CB11 höhere HER2/neu-Scores erhoben.

Mit diesen Erkenntnissen wird ersichtlich, dass der Antikörperklon CB11 im Vergleich zu den zwei anderen Klonen N12 und 4B5 die höchste Färbequalität (sowohl die unspezifische als auch die spezifisch epitheliale Bindung betreffend) aufwies. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen hohen Sensitivität des CB11-Antikörpers^{82,83}. Hierfür ist allerdings die HER2/neu-Nachweishäufigkeit mit diesem Klon geringer.

Neben der Epithelzellfärbung wurde auch die Bindung der Antikörper auf andere Zellarten beobachtet (nicht-epitheliale Färbung). Dabei zeigten alle drei Klone eine hohe Spezifität für Epithelzellen, wobei ebenfalls von allen drei Klonen auf den Präparaten der Lebermetastasen Hepatozyten in unterschiedlicher Intensität granulär angefärbt wurden (siehe Ergebnisse: **Tabelle 14**, Seite 34), was konform zur aktuellen Literatur geht⁸⁴. Schließlich könnte eine Behandlung mit dem anti-HER2/neu-Antikörper Trastuzumab bei tatsächlich hoher hepatozellulärer HER2/neu-Expression eine erhebliche Hepatotoxizität zur Folge haben. Neben den allgemeinen Nebenwirkungen einer Chemotherapie³⁶ sowie der bekannten Gefahr einer Herzinsuffizienz^{32,85} werden als Nebenwirkungen der Trastuzumabtherapie in der Literatur bislang nur drei Fälle von Hepatotoxizität im Rahmen der Brustkrebstherapie

beschrieben⁸⁶, ein Lebersversagen jedoch noch nie⁸⁷. Zusätzlich wurden alleine mit dem Klon 4B5 eine Anfärbung von Myozyten der Muscularis mucosae und Endothelzellen bei Gefäßanschnitten im Präparat beobachtet (**Tabelle 14**, Seite 34). Dies war jedoch bei der Auswertung nicht weiter störend, da die spezifische membranöse Epithelzellfärbung von Interesse war.

Eine weitere nicht zu wertende unspezifische Färbung waren Reaktionen weiterer Kompartimente epithelialer Zellen (abgesehen von der spezifischen Färbung der Zellmembran). Diese war bei allen Antikörpern mehr oder minder vorhanden (siehe Ergebnisse: **Tabellen 8, 9, 11 und 12**, ab Seite 28). Ein stark anfälliges Zellkompartiment war das Zytoplasma, welches bei 27,8% (66 von 237) der Präparate (Gesamtkollektiv mit Klon 4B5) gefärbt vorgefunden wurde. Weitere Studien, die auf eine zytoplasmatische HER2/neu-Färbung eingingen, zeigten ähnliche Ergebnisse: Pavlakis et al., 2007 beschrieben rund 12,3% ihrer mit dem Klon CB11 untersuchten kolorektalen Karzinome als zytoplasmatisch positiv⁸⁸. Kountourakis et al., 2006 fanden rund 17% positives Zytoplasma (ohne Spezifizierung des Antikörpers)⁸⁹. Park et al., 2011 beobachteten diese unspezifische Färbung in 23,4% der Fälle mit einer Intensität von mäßig bis stark bei Anwendung des HercepTest® (Firma Dako, Klon A0485) und in 8,2% in starker Intensität mit dem Klon 4B5⁹⁰. Zudem beschrieb die Arbeitsgruppe ebenfalls eine nukleäre Anfärbung, die unsererseits in keines der Präparate gefunden wurde. Bei allen angewendeten Antikörper war ebenfalls eine muzinöse Färbung in hohem Maße vorhanden. Grund hierfür wäre die bereits obenerwähnte unspezifische Bindung der Antikörper an makromolekulare Glykoproteine des Muzins.

Am häufigsten verwendet und Standard für die HER2/neu-Diagnostik sind aktuell die Antikörperklone A0485 und 4B5 (entsprechend der Testplattformen HercepTest® der Firma Dako und PATHWAY® der Firma Ventana, beide zugelassen von der FDA, *Food and Drug Administration*, amerikanische Gesundheitsbehörde), beide Klone werden als gleichwertig gewertet^{84,90} (siehe unten). Durch den Einsatz verschiedener HER2/neu-bindender Antikörper divergieren die Ergebnisse verschiedener Studien zum Teil stark⁴⁷. Eine Arbeitsgruppe aus Leiden, Niederlanden, stellte in einer Publikation Ergebnisse verschiedener Antikörper bei der HER2/neu-Testung beim kolorektalen Karzinom vor: dabei konnte eine Varianz zwischen den aufgeführten Studien von 0 bis 51 Prozent bei der spezifischen membranösen Färbung gesehen werden. Im Bereich der unspezifischen

zytoplasmatischen Färbung war die Varianz sogar zwischen 0 und 64 Prozent gelegen⁴⁷. Auch Yosepovich et al., 2010 beschreiben eine Varianz von 26 bis 42 Prozent der spezifischen epithelialen HER2/neu-Expression je nach benutztem Antikörperklon¹⁶. Der Grund für eine solche Diskrepanz ist einerseits sicherlich die unterschiedlichen Färbe- und Auswertmethoden (siehe dazu auch 4.1.2 und 4.1.3, ab Seite 62) aber auch die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen benutzten Antikörper gegen das Antigen HER2/neu^{84,91}.

Interessanterweise wechselte im Jahre 2008 die Firma Ventana den Klon CB11 in ihrem PATHWAY®-Testverfahren zum Klon 4B5⁹². Begründet wurde dies durch eine schärfere Membran- und geringere Hintergrundfärbung mit dem Klon 4B5 im Vergleich zu CB11, eine höhere Korrelation mit den Daten der Genamplifikation (FISH, siehe auch 4.1.4, Seite 70) sowie eine bessere Konkordanz zwischen verschiedenen Auswertern^{16,92,93}. Der Klon CB11 wurde allerdings im Jahre 2012 mit dem Bond™ Oracle™ Immunhistochemie-System der Firma Leica erneut zugelassen⁹⁴. Insgesamt konnte eine gute Konkordanz zwischen den zwei Antikörperklonen CB11 und 4B5 gesehen werden⁹³, was den Einsatz beider Antikörperarten rechtfertigen würde⁷⁵. Allerdings fanden Yosepovich et al., 2010 in ihrer Studie am Mammakarzinom den Klon 4B5 geeigneter als den CB11-Klon, da er besser mit den erhobenen FISH-Daten konkordant war¹⁶. Die Wissenschaftler argumentierten somit, dass ein Nachtesten mit Genamplifikation (FISH) im Falle eines Score 2+ beim primären Einsatz des Klones 4B5 statt CB11 vermindert werden könnte¹⁶. Powell et al., 2007 entschieden sich in ihrer Forschung am Mammakarzinom für den Einsatz des 4B5-Klons aufgrund einer schärferen Membranfärbung in Kombination mit einer geringeren zytoplasmatischen und vernachlässigbaren Hintergrundfärbung im Vergleich zum Klon CB11. Auch diese Arbeitsgruppe fand ein besseres Übereinstimmen der 4B5-Färbeergebnisse mit der FISH-Genamplifikation als mit dem Klon CB11 und schlußfolgerte, dass der Klon 4B5, trotz statistisch nicht relevanten Unterschieden, ein besser passender Prädiktor der HER2/neu-Überexpression mit höherer Sensitivität zu sein scheint als der Klon CB11 im direkten Vergleich mit der Genamplifikation⁹³.

Des Weiteren wird der Klon CB11 als zwar sehr spezifischer aber wenig sensitiver Antikörper gehandelt^{82,83}. Damit ist sein Einsatz in der Immunhistochemie als primäres Testverfahren zum Screening einer HER2/neu-Überexpression kritisch zu sehen: mit der Anwendung dieses Klons ist eine falsch-negative Wertung der Tumore wahrscheinlich, womit eventuell positive

Fälle verlorengehen. Vereinbar mit unseren Ergebnissen im kolorektalen Karzinom, fanden Cho et al., 2012 im Magenkarzinom eine geringere HER2/neu-Positivität mit dem Klon CB11 als mit anderen Klonen (A0485 und 4B5). Im Vergleich zur FISH hatte CB11 die höchste Spezifität aber geringste Sensitivität als die anderen Antikörperklone⁸³.

Grundsätzlich sollten nur die beiden bereits oben erwähnte validierte Antikörperklone A0485 (HercepTest®, Firma Dako) und 4B5 (PATHWAY®, Firma Ventana)^{39,42,75} zum Einsatz kommen. Bei einem Vergleich beider Antikörperklone durch Park et al., 2011 am Magenkarzinom konnte eine hohe Konkordanz der HER2/neu-Ergebnisse festgestellt werden, wobei auch zwei Einzelfälle totaler Divergenz beschrieben wurden (HER2/neu-Score 3+ mit HercepTest® und negativ mit dem Klon 4B5)⁹⁰. Zhou et al., 2013 beschrieben allerdings den HercepTest® (Klon A0485), aufgrund einer festgestellten höheren Diskordanz zwischen untersuchende Laboratorien, anfälliger für Auswertunterschiede als der Klon 4B5¹⁷. Des Weiteren werden dem HercepTest® (Klon A0485) eine schwächere Spezifität⁹² und Sensitivität⁸⁴ zugeschrieben.

Valtorta et al., 2015 untersuchten ebenfalls beide Klone auf kolorektalem Gewebe vergleichend und fanden, ebenso wie bei unseren Ergebnissen, teilweise auch große Unterschiede in der HER2/neu-Expression des gleichen Tumor je nach Antikörperklon⁸⁴. Die Wissenschaftler konnten mit dem Klon 4B5 eine deutlich höhere Konkordanz der HER2/neu-Nachweises mit der molekularbiologischen Methode SISH (*Silver In Situ Hybridization*) feststellen als mit dem HercepTest® (Klon A0485); falsch negative Ergebnisse wurden zudem lediglich mit letzterem Klon beobachtet. Die Autoren bevorzugten vorrangig aus letzterem Grund den Klon 4B5, insbesondere da ohnehin die Inzidenz an HER2/neu-Expression gering ist⁸⁴. Aufgrund eben genannten Erkenntnisse aus der Literatur setzten wir den Fokus auf den Klon 4B5 und untersuchten den Klon A0485 nicht weiter.

Zusammenfassend erwies sich auch in unseren Beobachtungen der CB11-Klon als spezifischster epithelialer HER2/neu-Antikörper aller drei untersuchten Klone mit geringster unspezifischen und Hintergrundfärbung. Selbst in beiden angewandten Arbeitskonzentrationen (0,26 und 1,5µg/ml), waren die CB11-Ergebnisse vergleichbar bei nur geringfügig vermehrter unspezifischer Färbung in der höheren Konzentration. Die spezifische Färbung und somit Aussage über eine HER2/neu-Expression der Präparate war mit den Klonen CB11 und 4B5 vergleichbar. Der Klon N12 ist als methodisch ungeeignetsten

Antikörper für die spezifische HER2/neu-Expression auf kolorektalem Gewebe nicht zu empfehlen. Mit einem erheblichen Anteil an unspezifischer Färbung ist eine genaue Auswertung nicht gewährleistet und dieser Antikörperklon zu Stratifizierungszwecken für eine anti-HER2/neu-Therapie nicht geeignet.

Schlußendlich sind unsere beobachteten Ergebnisunterschiede zwischen den Antikörpern mit der aktuellen Studienlage vereinbar. Die Divergenz der Ergebnisse ist wohl den verschiedenen Eigenschaften insbesondere der Sensitivität der Antikörper zuzuschreiben^{84,91,92}. Demnach stellt sich die entscheidende Frage nach dem Einsatz des richtigen Antikörperklons. Unsere Entscheidung, den Antikörperklon 4B5 im weiteren Studienverlauf einzusetzen stützte sich einerseits, wie ausdrücklich von Rüschoff et al., 2010 empfohlen wird⁴², auf die Zulassung des Klons zu diagnostischen Zwecken sowie andererseits auf die obenerwähnten in der Literatur publizierten Beobachtungen.

Abschließend kann der Einsatz des HER2/neu-Antikörpers 4B5 als bereits methodisch anerkannten Klon im Diagnostik-Testverfahren PATHWAY® der Firma Ventana Medical Systems beim kolorektalen Karzinom empfohlen werden. Sicherlich ist aber eine Standardisierung mit Angabe zum Gebrauch eines sensitiven und spezifischen Antikörpers von Nöten^{79,95,96,97}.

4.1.2. Immunhistochemische Verfahren

Nicht nur die Vielfalt an verschiedenen HER2/neu-Antikörper, sondern auch die unterschiedlichen Methoden des Antigennachweises tragen zu den zum Teil weit auseinanderliegenden publizierten Ergebnissen bei^{45,47,64}. Alleine das immunhistochemische Verfahren spielt wohl eine große Rolle bei der Antigendarstellung. Wie auch in unserer Studie, ergaben die zwei Histologieverfahren (Kryo- vs. Paraffinhistologie) zum Teil erhebliche Diskrepanzen im HER2/neu-Antigennachweis und die Ergebnisse korrelierten statistisch nicht. Im direkten Vergleich überwog die Paraffinhistologie mit höheren Prozentzahlen positiver Epithelzellen in allen Gewebetypen. Hingegen war die Färbeintensität (und somit der HER2/neu-Score) in den malignen Gewebearten mit der Kryohistologie höher.

Selbst bei bekannten und etablierten immunhistologischen Verfahren gibt es viele Varianten in der Ausführung. Von der Aufbewahrung oder Handhabung der Objektträger, über die Gewebefixierung bis hin zu Antikörper-Inkubationszeiten, befinden sich in einem

Färbeprozess viele variable Faktoren, die den Antigennachweis entscheidend beeinflussen können^{16,47,61,63,64,68,92,93,96,98,99,100}. Dies wurde von Blok et al., 2013 mit ihrem Vergleich fünf verschiedener Studien belegt, in denen die Nachweishäufigkeit des HER2/neu-Antigens mittels des gleichen Antikörperklons CB11 zwischen 22 und 82 Prozent schwankte⁴⁷.

Mirlacher et al., 2004 zeigten zum Beispiel, dass eine lange Lagerzeit der Gewebeproben einen Einfluss auf den HER2/neu-Nachweis haben (bereits ab 2 Wochen Lagerzeit konnten Unterschiede festgestellt werden)¹⁰¹. Allerdings scheint dies überwiegend für Paraffinblöcke zu gelten, denn Ross et al., 1999 sehen keinen Effekt auf die Proteinexpression im Gewebe durch Lagerung bei der Kryo- im Vergleich zu Paraffinhistologie¹⁰⁰. Hier könnte eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisunterschiede (insbesondere der unterschiedlichen HER2/neu-Scores) bestehen, da die paraffinhistologischen Untersuchungen gebündelt (im Jahr 2012) aus dem Archiv des pathologischen Institutes zum Teil Jahre nach Einbettung der Gewebe durchgeführt wurden.

Des Weiteren beschreiben einige Arbeitsgruppen eine Abnahme der Färbung oder gar teilweisen Verlust des HER2/neu-Antigens durch die Gewebefixierung im Paraffinfärbeprozess im Vergleich zum Kryoverfahren^{96,102,103,104}. Ross et al., 1999 erwähnen explizit die Dauer, den Fixierungsvorgang sowie die Gewebeerarbeitung und Temperaturschwankungen während der Paraffineinbettung als potentielle Faktoren für einen HER2/neu-Proteinverlust¹⁰⁰ beim Mammagewebe. Shah und Chen, 2011 erklären ein Zugangshindernis des Antikörpers zum Antigen durch Formaldehyd-induzierte Proteinvernetzungen bei der Paraffinhistologie⁹². Dies könnten Ursachen für die geringer ausfallende HER2/neu-Expressionsrate oder -Intensität weiterer Studien sein, die beide Färbemethoden verglichen^{91,105}. Ross et al., 1999 beschrieben einen Mangel an Übereinstimmung zwischen dem HER2/neu-Nachweis mit Paraffinhistologie und Genamplifikation im Vergleich mit dem Kryoverfahren. Zudem fanden sie eine höhere Sensitivität und Spezifität der Färbung mit der Kryo- als mit der Paraffinhistologie¹⁰⁰.

Van Diest et al., 1991 beschrieben eine gute Konkordanz der Ergebnisse zwischen Kryo- und Paraffinhistologie beim Mammakarzinom, beobachtete jedoch eine höhere membranöse Färbung der Epithelzellen bei frischen Geweben sowie eine stärkere diffuse Färbung auf Paraffinpräparaten (allerdings bei Färbung mittels Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode, kurz APAAP)¹⁰⁵.

Für die Paraffinhistologie sprechen allerdings ein besserer Erhalt der Gewebemorphologie und eine homogenere Färbung des gesamten Präparates¹⁰⁵ ohne größere störende unspezifische Hintergrundfärbung und somit kein negativer Einfluss auf die HER2/neu-Auswertung.

Andererseits besteht bei der Kryoimmunhistologie kein langwieriger und gewebestrapazierender Konservierungsprozess, der Antigenen schaden könnte. Ross et al., 1999 validierten die Kryohistologie beim Mammakarzinom indem sie eine gute Korrelation zwischen erhobenen histologischen und molekularbiologischen genbasierten HER2/neu-Ergebnissen zeigten¹⁰⁰.

Penault-Llorca und Mitarbeiter fanden 1994 in einer Antikörper und Methoden vergleichenden Studie am Mammakarzinom die besten übereinstimmenden HER2/neu-Ergebnisse mit dem Klon CB11 auf Kryoschnitte im Vergleich zu molekularen Testverfahren (Southern- und Northern-blot Analysen)⁹⁶.

Die bedeutende hier vorliegende Varianz in den HER2/neu-Ergebnissen zwischen den zwei angewendeten Färbemethoden kann sicherlich auf die Methodik selbst zurückgeführt werden, besteht jedoch in unseren Augen sicherlich überwiegend in der möglichen intratumorösen Heterogenität (siehe 4.2.2., Seite 76): die Gewebeproben für jeweils Kryo- und Paraffinhistologie wurden bei Aufbereitung in der Pathologie aus unterschiedlichen Tumorarealen gewonnen und könnten somit deutlich variieren.

Methodisch wurde in dieser Arbeit die Kryoimmunhistologie bevorzugt, da bei dieser einerseits die Gewebeaufbereitung einfacher und andererseits der Färbeprozess gewebeschonender ist. Somit wurde ein möglicher Verlust des HER2/neu-Antigens beziehungsweise die beobachtete Abschwächung der Färbeintensität der Paraffinpräparaten umgangen, die einen falsch-niedrigen Score zur Folge hätte und somit eine Trastuzumab-Therapie ausschließen würde.

Beide Verfahren sind methodisch zum Nachweis von Molekülen anerkannt und werden zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Fraglich ist, ob durch die Paraffinhistologie Patienten nicht falsch-negativ getestet werden und diesen somit die Antikörpertherapie verwehrt bleibt.

In unserem Fall ist eine endgültige Aussage bezüglich den zwei Färbemethoden bei der niedrigen nicht repräsentativen Fallzahl an paraffinhistologisch untersuchten Proben nicht eindeutig möglich.

4.1.3. HER2/neu-Auswertung beim kolorektalen Karzinom

Während für das Mammakarzinom ganz strikte Auswertkriterien zum HER2/neu-Expressionsprofil gelten⁴¹ (siehe Einleitung: **Tabelle 1**, Seite 4), entwickelten Pathologen für das Magenkarzinom neue Auswertregeln⁷⁹, nachdem ein signifikanter Unterschied im HER2/neu-Status zwischen den zwei Tumoridentitäten nachgewiesen wurde⁴². Neben Veränderungen am Stichwert (Cut-off) zur Therapieindikation benötigter positiver Zellen oder dem Ausmaß der membranösen Färbung⁷⁹, wurde von Rüschoff et al., 2010 die sogenannte „Objektivregel“ entwickelt, um die Vergabe des Färbe-Scores zu objektivieren⁴². Demnach sollte die Variabilität zwischen den Auswerter vermindert und die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses gesichert werden.

Zur Auswertung des HER2/neu-Status beim kolorektalen Karzinom findet man in der aktuellen Literatur keine eindeutigen Kriterien. Während ältere Arbeiten die bloße Färbung der Zellen als positiven HER2/neu-Status werteten (zum Teil mitsamt zytoplasmatischer Färbung), orientierten sich neuere Studien entweder an die Mammakarzinomkriterien (BCSS für *Breast Cancer Scoring System*) oder, die jüngsten Arbeiten betreffend, bereits an die Magenkarzinomauswertung (GCSS für *Gastric Cancer Scoring System*) nach Hoffmann⁷⁹. Neueste Entwicklungen veröffentlichten jüngst Valtorta et al., 2015 die ein eigenes HER2/neu-Scoring-System für das kolorektale Karzinom im Rahmen der aktuell laufenden HERACLES-Studie (für *HER2 Amplification for Colo-rectal Cancer Enhanced Stratification*) in Anlehnung an die Magenkarzinomrichtlinien (GCSS) definierten⁸⁴; demnach werden die Patienten für die Studie stratifiziert. Diese Auswertungskriterien gilt es jedoch erst anhand der Studienergebnisse zu validieren (siehe unten).

Nebst unspezifischer und nicht epithelialer Färbung, welche ebenso akribisch dokumentiert wurde, erfolgte in dieser Arbeit die Erhebung der spezifischen HER2/neu-Expression auf epithelialen Zellen gemäß dem Magenkarzinom-Scoring-System (GCSS) und der Objektivregel (siehe Einleitung: **Tabelle 1**, Seite 4 und Material und Methoden: **Abbildung 4**, Seite 22). Ein Stichwert wurde bei der Auswertung ausgeblendet; ein Präparat wurde als HER2/neu positiv befundet sobald eine spezifisch membranös gefärbte Epithelzelle nachzuweisen war (siehe 2.2.6., Seite 21). Die Beurteilung der Ergebnisse konnte dann je nach Auswertkriterien erfolgen.

Bei der Anwendung der Mammakarzinom-Auswertkriterien (BCSS) an unserem Kollektiv, wären alle untersuchten Proben negativ einzuschätzen. Zwar waren bei 13 der 237

untersuchten Gewebeschnitte (5,5%) eine spezifische zirkuläre membranöse Färbung gesehen worden (siehe Ergebnisse: **Tabelle 24**, Seite 46), allerdings jeweils nur in einem sehr kleinen Prozentsatz (meist nur 2%) weit unterhalb des geforderten Cut-off von über 10% positiver Epithelzellen. Demnach wäre im kolorektalen Karzinom keine HER2/neu-Überexpression vorhanden.

Bei Anwendung der Auswertung unserer Objektträger nach den Magenkarzinomrichtlinien (und entsprechendem Stichwert von $\geq 10\%$ spezifisch positiver Tumorzellen im Präparat), konnte immerhin noch die Hälfte der Nachweishäufigkeit (ohne Stichwert) in allen Gewebearten festgestellt werden, wobei sich der Anteil an hohen therapielevanten Scores, insbesondere Score 3+ in den malignen Geweben, deutlich nach oben verschob (siehe unten **Tabelle 35** bzw. **Tabelle 26** im Vergleich zu **Tabelle 25**, Seite 46). Demnach wäre jeder zweite positiv befundene Tumor und drei Viertel der positiv befundenen kolorektalen Lebermetastasen für eine Trastuzumab-Therapie geeignet. **Tabelle 35** widerspiegelt die Ergebnisse an HER2/neu-Expression (Prozent positiver Proben und davon als Score 3+ befundet) je nach angewendeten Auswertkriterien.

		HER2/neu-Nachweis bei Auswertung			
		nach Mamma- karzinom (BCSS)	nach Mamma- karzinom (BCSS) ohne Cut-off von >10%	nach Magen- karzinom (GCSS)	nach Magen- karzinom (GCSS) ohne Cut-off von $\geq 10\%$
Mukosae	%	0/89 (0%)	3/89 (3,4%)	7/89 (7,9%)	12/89 (13,5%)
	3+	0/0 (0%)	1/3 (33,3%)	1/7 (14,3%)	2/12 (16,7%)
Tumore	%	0/89 (0%)	7/89 (7,9%)	18/89 (20,2%)	39/89 (43,8%)
	3+	0/0 (0%)	3/7 (42,9%)	9/18 (50,0%)	13/39 (33,3%)
Metastasen	%	0/58 (0%)	3/58 (5,2%)	12/58 (20,7%)	24/58 (41,4%)
	3+	0/0 (0%)	1/3 (33,3%)	9/12 (75,0%)	12/24 (50,0%)

Tabelle 35. HER2/neu-Nachweishäufigkeit (%) und Anteil an Score 3+ befundeter Gewebe unter den positiven Fällen (3+) je nach Auswertung (BCSS: *Breast Cancer Scoring System*, GCSS: *Gastric Cancer Scoring System*) am Gesamtkollektiv anhand des Antikörperklones 4B5 (entsprechend **Tabellen 25** und **26**, siehe Seiten 46 und 47). Grau hinterlegt sind die Ergebnisse, mit denen die weiteren Korrelationen durchgeführt wurden.

Wie unterschiedlich eine Auswertmethode oder eine Anpassung der Auswertung an das entsprechende Gewebe wichtig sein kann, zeigte bereits der Vergleich zwischen den Tumorentitäten Mamma- und Magenkarzinom. Eine Auswertung des HER2/neu-Status beim Magenkarzinom nach dem Brustkrebs-Scoring-System zeigt eine erhebliche Rate an falsch-negative Befunde um bis zu 50%^{39,42}. Park et al., 2012 zum Beispiel untersuchten ihr

Magenkarzinomkollektiv anhand der beiden Auswertkriterien und fanden deutlich höhere Scores mit dem angepassten Magenkrebs-Scoring-System heraus: 5,6% zu 8,7% mit dem HercepTest® und 6,5% zu 11,4% mit dem Antikörperklon 4B5 im Vergleich zum Brustkrebs-Scoring-System⁹⁰. Des Weiteren fanden sie mit den Magenkriterien eine höhere Sensitivität zum Nachweis einer HER2/neu-Überexpression verglichen an der durchgeführten Genamplifikation (mittels SISH, *Silver In Situ Hybridization*)⁹⁰.

Tapia und Mitarbeiter, 2007 untersuchten etliche Tumortypen auf eine HER2/neu-Überexpression unter Anwendung der Mammakarzinom-Auswertkriterien und beobachteten somit, im Vergleich mit der Genamplifikation (mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung), offensichtliche falsch-negative Ergebnisse der Immunhistologie⁹⁹. Übrigens fand diese Arbeitsgruppe im kolorektalen Karzinom keine HER2/neu-Expression, was mit unserer Beobachtung (Kollektiv mittels Mammakriterien ausgewertet) übereinstimmt. Dies zeigt die Dringlichkeit einer Optimierung der Auswertkriterien je nach Karzinomidentität. Ein Übertragen eines Scoring-Systems von einer Tumorart auf die andere ist demnach aufgrund der unterschiedlichen Tumorarchitekturen nicht richtig⁷⁹. Rüschoff und Mitarbeiter, 2010 versuchten es am Beispiel des Magenkarzinoms zu erklären: dort besäßen Tumordrüsen seitens des Drüsenlumen (luminal, sprich Oberfläche des Epithels) keine Rezeptoren, sondern nur an den Zell-Zell-Kontaktzonen, die bei gering differenzierten Adenokarzinomen selten komplett zirkulär vorzufinden sind³⁹. Dies lässt sich auf das kolorektale Gewebe und Adenokarzinome übertragen, wie es aus unseren Beobachtungen hervorgeht und in der Literatur beschrieben wird⁸⁴. Darum ist eine Anwendung der Mammakarzinom-Auswertkriterien beim Magenkarzinom oder anderen Adenokarzinomarten nicht korrekt.

Unsere Ergebnisse nach Magenkriterien sind eher im Einklang mit bestehenden Publikationen und zeigen bei höherem Prozentsatz an HER2/neu-positiven Zellen auch einen höheren HER2/neu-Score. Somit wären Patienten mit einem HER2/neu-positiv befundenen Tumor auch mit höherer Wahrscheinlichkeit für eine anti-HER2/neu-Therapie geeignet. Dies lässt die Überlegung zu, die Magenkarzinomrichtlinien auf das kolorektale Karzinom zu übertragen.

In wie fern die neuesten Auswertkriterien für das kolorektale Karzinom von Valtorta et al., 2015 zutreffend sind muss sich erst noch in der laufenden HERACLES-Studie herausstellen^{84,106}. Es wurde die geltende Auswertung des Magenkarzinom modifiziert; im

engen Vergleich mit der molekularbiologischen HER2/neu-Amplifikation setzten die Autoren den Stichwert (Cut-off) positiver Tumorzellen auf >50%, hierfür werden allerdings Score 2+ befundene Tumore als positiv gewertet (keine Anwendung der Objektivregel⁴²; granuläre Färbung zählt zu Score 1+).

Das Definieren eines Stichwertes (Cut-off) erfolgt gewöhnlich in Zusammenschau mit anderen Faktoren, zum Beispiel anhand der Korrelation eines Antigennachweises zwischen verschiedenen Methoden (histologische versus molekularbiologische Verfahren)³⁶ oder anhand von Ergebnissen aus klinischen Studien und der Beobachtung von Therapieansprechraten unter dem entsprechenden Expressionsprofil. So wurden in den USA im Jahr 2013 die seit 2007 geltenden Empfehlungen zur HER2/neu-Auswertung beim Mammakarzinom revidiert und der Stichwert gesenkt (von 30 auf 10 Prozent positive Tumorzellen, siehe unten)⁴⁰. Diese Variabilität des Stichwertes ist nicht ungewöhnlich und besteht auch in anderen Bereichen wie zum Beispiel beim Erheben des Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom¹⁰⁷.

Aktuell gibt es beim kolorektalen Karzinom keine Empfehlungen über einen Stichwert positiver Karzinomzellen da notwendige klinische Erkenntnisse noch gänzlich fehlen; ein Festlegen des Cut-off anhand der Konkordanz mit der HER2/neu-Genamplifikation wie es Valtorta et al., 2015 in den selbsternannten Auswertkriterien für die HERACLES-Studie veröffentlichten⁸⁴, ist bei nicht geklärter Bedeutung der FISH beim kolorektalen Karzinom kritisch zu sehen. Die Ergebnisse der HERACLES-Studie werden darüber Klarheit schaffen und gegebenenfalls den Stichwert im Verlauf korrigieren.

Aufgrund dieser noch bestehenden Unklarheit über einen gerecht werdenden Stichwert, haben wir jedes noch so wenig HER2/neu-positive Gewebe in unsere Darstellungen und Korrelationen übernommen und keinen Cut-off eingeführt.

Neben Antikörperauswahl und Färbemethodik kommt man auch bei der Auswertung zum Schluß, dass eine Standardisierung der Auswertung mit festgelegten Kriterien zur Beurteilung einer HER2/neu-Überexpression beim kolorektalen Karzinom notwendig ist^{45,61,63,79}. Man darf mit Hochspannung auf die Validierung der HERACLES-Auswertkriterien für das kolorektale Karzinom warten^{84,106}.

Ein wichtiger nicht zu vernachlässigender Aspekt der semi-quantitativen Auswertung ist die Anfälligkeit für Abweichungen zwischen unterschiedliche Betrachter. Gerade die

immunhistologischen Analysen sind anfällig für eine Variabilität zwischen den Auswertenden^{92,97}. In der Pathologie ist daher eine Befundbesprechung Gang und Gebe. Um diese Diskrepanz in unserer Studie vorzubeugen, wurden genaue Kriterien für Auswertareale festgelegt, wie Unversehrtheit der Präparate oder konsequenter Ausschluß nicht repräsentativer Areale. Das Auswertverfahren nach dem Magenkrebs-Scoring-System (GCSS) wurde in einer Hospitation bei Pathologen Prof. Dr. J. Rüschoff, Pathologie Nordhessen in Kassel, erlernt und trainiert. Zudem wurden die Objektträger in regelmäßigen Abständen zusammen mit meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. B. Mayer durchgesehen und eventuelle Ergebnisse diskutiert und reevaluiert. Letztlich erfolgte eine Validierung der Ergebnisse stichprobenartig durch meine erfahrene Kollegin und Doktorandin aus meiner Arbeitsgruppe mit einer sehr hohen Übereinstimmungsrate.

Eingegangen werden muß zudem noch auf die unzureichend untersuchte Bedeutung des zytoplasmatischen HER2/neu-Nachweises in den Tumorzellen. Bislang wurde auf andere Färbemuster außerhalb der Membran keine Beachtung geschenkt, da es nicht mit der Wirkung von Trastuzumab korrelierte⁴⁷. Zudem scheint kein Zusammenhang zwischen dem zytoplasmatischen HER2/neu-Nachweis und einer Genamplifikation zu bestehen⁶⁸, wo doch letztere mittels FISH zur Indikationsstellung herangezogen wird (siehe 4.1.4, Seite 70). In unseren Ergebnissen waren zwischen 20,5% (8 von 39) mit dem Klon CB11 und 71,8% (28 von 39) der Tumorzellen mit dem Klon 4B5 zytoplasmatisch HER2/neu-positiv, sprich deutlich mehr als eine membranöse HER2/neu-Färbung beobachtet worden war. Dies entspricht auch den Werten aus Studien, die die zytoplasmatische HER2/neu-Färbung im kolorektalen Karzinom^{67,68,108} und Lebermetastasen⁶⁸ untersuchten. Blok et al., 2013⁴⁷ stellte Publikationen gegenüber, wobei eine Nachweishäufigkeit zwischen 0% und 84% der Tumorzellen beschrieben wurde. Verschiedene Hypothesen wurden zur Erklärung des Sachverhaltes aufgestellt: Pavlakis et al., 2007, die selbst eine zytoplasmatische Färbung in 12,3% der mit dem Klon CB11 untersuchten Kolonkarzinome (bei einer Intensität von schwach bis mäßig) beobachteten, zogen ein Färbeartefakt, eine Kreuzreaktion bei der Färbung oder ein lösliches zytoplasmatisches Vorläuferprotein des HER2-Rezeptors in Betracht⁸⁸. Gleiches postulierten Osako et al. bereits im Jahre 1998¹⁰⁹. Hiergegen sprechen allerdings Untersuchungen von Half et al., 2004, die eindeutig in Kolonkarzinom-Zelllinien das HER2/neu-Protein in der Zellmembran sowie in Zellkompartimenten des Zytoplasmas

durch Immunoblot feststellen konnten⁶⁸. Denkbar wäre auch eine Homodimerisierung der zytoplasmatischen HER2-Rezeptoren mit darauffolgender intrazellulärer Aktivierung der Tyrosinkinase und somit Auslösen der Signalkaskade (siehe Einleitung: Abschnitt 1.3.2., Seite 6)⁴⁷.

4.1.4. Bedeutung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) gilt als Methode der Wahl zum Nachweis von HER2/neu-Genamplifikationen⁸¹ und wird als zweites HER2/neu-Nachweisverfahren neben der Immunhistochemie (IHC) zur Indikationsstellung einer Trastuzumab-Therapie beim Mamma- und Magenkarzinom eingesetzt.

Ausschlaggebend für einen positiven FISH-Status ist eine vorliegende Genamplifikation, definiert als einen Quotienten der Summe aller genspezifischen Signale und der Summe aller Chromosom-17-spezifischen Signale in 20 kohäsiven auswertbaren Tumorzellen (HER2/CEP17-Ratio, CEP für *chromosome enumeration probe*)³⁹ > 2.2 beim Mamma- und ≥ 2.0 beim Magenkarzinom¹⁷ (siehe Einleitung: **Tabelle 1**, Seite 4). Bislang kann eine oft beschriebene vorliegende Polysomie mit erhöhter Anzahl an HER2/neu-Genkopien nicht zur Aussage über den Genamplifikationsstatus beim Magenkarzinom herangezogen werden³⁹. Etliche Publikationen über das Magenkarzinom setzen jedoch eine Anzahl > 6 Genkopien als Amplifikation gleich^{17,29,79}. Doch die genaue Anzahl ist nicht definiert: andere Studien setzten eigene unterschiedliche Stichwerte ein^{61,63}. Im Übrigen verglichen Valtorta et al., 2015 die FISH mit der *Silver In Situ Hybridization* (SISH) und fanden eine hundertprozentige Übereinstimmung⁸⁴.

In der Kryohistologie positiv getestete gutartige sowie maligne Gewebeproben wurden stichprobenartig im Rahmen einer Kooperation durch das pathologische Institut Innenstadt der Universität München auch nach einer möglichen HER2/neu-Genamplifikation mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung untersucht. Alle, inklusive Tumore mit starker HER2/neu-Expression (Score 3+) in der Immunhistochemie, zeigten keinen nennenswerten Quotienten und waren somit als FISH negativ einzustufen.

In der Literatur wird allerdings eine HER2/neu-Genamplifikation beim kolorektalen Karzinom zwischen 0 und 30 Prozent^{61,64} sowie eine gute Konkordanz des HER2/neu-Nachweises zwischen dem histologisch erhobenen Score 3+ und der FISH beschrieben^{47,64,66,84,88} (Pavlakis et al., 2007 übernahmen den Cut-off von 2.0⁸⁸). Letzteres ist bereits aus Studien über das

Mammakarzinom bekannt^{16,33,92,93,99,110}, woraus sich letztendlich der entsprechende Stichwert für die HER2/CEP17-Ratio ergab¹⁰⁴: ab dem IHC-Score 2+ wurden nämlich beginnende Abweichungen zur Genamplifikation beobachtet^{16,92,111}. So definierten auch Valtorta et al., 2015 ihren Stichwert bei der Auswertung kolorektaler Tumore⁸⁴.

Doch gibt es in der Literatur wie auch bei uns widersprüchliche Ergebnisse, die bereits häufig diskutiert wurden. Obwohl eine HER2/neu-Überexpression beim Mammakarzinom selten in Abwesenheit einer Genamplifikation zustande kommt⁸¹, gibt es solche Fälle beim kolorektalen Karzinom dennoch zur Genüge: Kavanagh et al., 2009 und Pavlakis et al., 2007 hatten jeweils bei ihren Untersuchungen eine geringere Rate an HER2/neu-Nachweis mittels FISH im Vergleich zur IHC (respektive 3,7% zu 5,6% und 3% zu 11%)^{63,88}. Park et al., 2007 konnten nur bei 2 von 27 (7,4%) Score 3+ bewerteten kolorektalen Karzinomen eine Genamplifikation mit FISH beobachten⁶¹. Nathanson et al., 2003 fanden eine HER2/neu-Nachweishäufigkeit von 3,6% mit der IHC im Gegensatz zu 2,4% mit FISH (Kolonkarzinome mittels Mammaauswertkriterien)⁶⁴ in einem Fall konnte sogar bei einem IHC 3+ befundenen Tumor keine Genamplifikation (mit FISH) nachgewiesen werden⁶⁴. Diese Beobachtung wurde ebenfalls in Studien über das Mammakarzinom beschrieben: 3 bis 22 Prozent aller HER2/neu-positiven Fällen wurden IHC Score 3+ aber FISH negativ befundet^{92,104,110,112,113}. Auch beim Magenkarzinom wurden in der bahnbrechenden ToGA-Studie im Jahre 2010 einige Fälle von völliger Diskrepanz zwischen IHC und FISH beschrieben (15 der 271 IHC3+ Tumore waren FISH negativ, entspricht 5,5%)³⁶.

Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz könnten einerseits falsch positive Ergebnisse der Immunhistochemie durch ihre Variabilität und möglichen Störfaktoren^{66,75} wie Fixierungsprozess^{92,93}, Gewebeparbeitung⁹², unterschiedlicher Sensibilität und Spezifität des eingesetzten Antikörpers sowie Subjektivität und Reproduzierbarkeit der Auswertung⁹³ sein. Liu et al., 2009 fanden beim Mammakarzinom heraus, dass es weniger diskordante Fälle mit IHC 3+ und FISH negativ gibt, wenn in der Immunhistologie-Auswertung der Stichwert bei 30% positiver Zellen liegt¹¹⁴. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Empfehlungen der ASCO/CAP (*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*) angeglichen und demnach mit den HER2/neu-Diagnostik-Leitlinien der FDA (*Food and Drug Administration*) uneins⁴¹. Da in unserem Kollektiv die nachgewiesene HER2/neu-Überexpression häufig in nur wenigen Zellen vorlag und, den Mammakarzinom-

Auswertkriterien zur Folge, kein einziger Fall positiv zu werten war, könnte hiermit das vollständige Fehlen einer Genamplifikation mittels FISH erklärt werden.

Andererseits wird die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung als komplexe und arbeitsintensive Methodik mit schwieriger Auswertung beschrieben^{92,110,115}, insbesondere sind das Vorliegen einer Polysomie kann die Auswertung der FISH erheblich erschweren⁹²: in einer großangelegten Studie am Mammakarzinom mit über dreitausend Fällen zeigte sich die FISH-Methode eine signifikant höhere Scheiterquote und längere Interpretationszeit im Vergleich zur Immunhistochemie¹¹⁶.

Aber auch die intratumorale Heterogenität könnte für die Differenz der Ergebnisse verantwortlich sein⁶⁶: bei unterschiedlich untersuchten Gebieten eines Tumors wäre eine genetische Divergenz während der klonalen Vermehrung innerhalb des Tumors denkbar⁹² (siehe auch 4.2.2., Seite 76).

Abgesehen von methodischen Fehlerquellen, besteht die Möglichkeit dass die Genamplifikation nicht der primäre oder einzige Mechanismus für eine Rezeptorüberexpression ist^{61,68} und diese auch ohne Amplifikation stattfinden kann: eine in der Literatur aufgeführten Hypothese wäre eine mögliche zusätzliche Rezeptorsynthese durch anderweitig aktivierte Genabschnitte, die bei der FISH nicht erfasst werden^{61,117}. Des Weiteren erwägen Wissenschaftler die Erklärung einer HER2/neu-Überproduktion auf Transkriptions- oder posttranskriptioneller Ebene^{93,117}. Kameda et al., 1990 fanden im Magenkarzinom erhöhte Spiegel an Transkriptionsfaktoren (namentlich Sp1), die an der HER2/neu-Promoterregion (ErbB2) agieren¹¹⁸. Außerdem können falsche Ergebnisse in der FISH an ungewöhnliche HER2/neu-Genotypen oder zytogenetischen Veränderungen wie zum Beispiel der Chromosom-17-Deletion, auf dem sich das HER2/neu-Gen befindet, liegen^{110,115}. Eine weitere, in diese Richtung gehende, viel diskutierte Ursache könnte eine Chromosom-17-Polysomie sein^{89,93,110}: diese wurde beispielsweise bei einem Prozentsatz von 20 bis 30 Prozent der invasiven Mammakarzinome gefunden, und interessanterweise in Fällen, die IHC 3+ und FISH negativ waren^{92,110,113}. Lal et al., 2003 und Varshney et al., 2004 fanden unabhängig voneinander heraus, dass polysome nicht amplifizierte Mammakarzinomzellen eine erhöhte HER2/neu-Kopie und somit eine erhöhte Proteinproduktion und damit HER2/neu-Rezeptorüberexpression vorweisen^{113,119}. Tse et al., 2011 beschreiben die Polysomie 17 wiederum als selten und empfehlen zur Vorbeugung von Fehlergebnissen die Bildung des Quotienten mit einem anderen eusomen Genloci statt dem CEP17 nahe dem

Zentromer¹²⁰. Laut der ToGA-Studie wiesen allerdings weniger als 10% der Magenkarzinome eine Polysomie auf³⁹. In welcher Häufigkeit sie beim kolorektalen Karzinom vorliegt ist aktuell lediglich aus der Studie von Seo et al., 2014 mit einer geringen Rate von 2,6% bekannt⁶⁹. Es stellt sich folglich die Frage, ob eine Bestimmung des HER2/neu-Gentranskriptes (in Form der mRNA, *messenger-ribonucleic acid*) nicht aufschlussreicher und an Stelle der Genamplifikation geeigneter wäre^{69,90,121}. Half et al., 2004 fanden zum Beispiel einen erhöhten Spiegel an mRNA bei membranpositiven kolorektalen Karzinomen und Metastasen⁶⁸, Seo et al., 2014 fanden eine hohe Konkordanz zwischen der membranösen HER2/neu-Proteinexpression und -transkription⁶⁹.

Aber auch in gegengesetzter Richtung gibt es publizierte Daten über genamplifizierte Tumore, die in der Immunhistologie keine HER2/neu-Expression zeigten (IHC Score 0). Park et al., 2012 erwähnen in ihrer Studie bis zu 2,8% SISH-positive, IHC-negative Magenkarzinome⁹⁰. Im Kollektiv der ToGA-Studie waren 10,4% (61 von 584) solcher Fälle vorhanden³⁶. Beim kolorektalen Karzinom beobachteten Seo et al. (2014) 12 von 539 Fälle (2,2%) mit Genamplifikation und negativer IHC⁶⁹. Dies zu erklären versuchten Prins et al., 2013, in dem sie den HER2/neu-Proteinverlust in Form von fehlerhafter Proteinfaltung, fehlender Glykosylierung oder falschem Bestimmungsort vermuten (Beobachtungen vergleichbar im Ösophaguskarzinom)¹²². Auch wenn eine Argumentation in diese Richtung einfacher scheinen mag (nicht jede amplifizierte Zelle muss eine Proteinüberexpression aufweisen), zeigt die Datenlage dennoch, dass Genamplifikation und Rezeptorüberexpression nicht zwangsläufig übereinstimmen und vermutlich andere molekularbiologischen Faktoren eine Rolle spielen.

Schließlich, auch wenn Pauletti et al., 2000 beim Mammakarzinom der FISH im Vergleich zur IHC die höhere prognostische Wertigkeit zuschreiben¹⁰⁴ (da IHC-/FISH+ Fälle vergleichbar mit IHC+/FISH+ und IHC+/FISH- vergleichbar mit IHC-/FISH-), bleibt die Histologie der FISH im Magenkarzinom als Screening-Methode überlegen^{41,90,123} und als primäre Testung bestehen³⁹: FISH positive Fälle mit geringer Färbereaktion in der Immunhistochemie (Score 0 und 1+) zeigten in der ToGA-Studie keinen Überlebensvorteil bei einer verabreichten Trastuzumabtherapie³⁶. Dies unterzeichnet, dass die Immunhistologie der Genamplifikation überlegen ist⁹⁰. Auch in anderen Gewebearten wie Brust- und Ösophaguskarzinome bleibt die Immunhistochemie das primäre Testverfahren der Wahl zum Nachweis einer HER2/neu-Überexpression^{41,123,124}. Beweisend hierfür ist zudem ein besonderer Fall in einer 2004

publizierten prospektiven Studie, in der bei einem IHC-Score 2+/FISH negativ getesteten Patienten ein partielles Ansprechen auf eine Trastuzumab/Irinotecan-Therapie beobachtet werden konnte⁵⁸ (siehe dazu auch 4.2.2., Seite 76). Seo et al., 2014 erklärte die IHC durch ihre hohe Konkordanz mit anderen Nachweisverfahren (SISH, mRNA, TMA) ebenfalls als erste Screening-Methode zum HER2/neu-Nachweis beim kolorektalen Karzinom⁶⁹.

Wie auch Park et al., 2007⁶¹, konnten wir bei unseren kolorektalen Karzinomen und hepatischen Metastasen keine Assoziation von histologisch nachgewiesener HER2/neu-Überexpression und Genamplifikation feststellen. Unterstrichen wird dies durch die Beobachtung von Half et al., 2004, die ein vollständiges Fehlen einer Genamplifikation in membranös HER2/neu-exprimierenden Kolonkarzinom-Zelllinien (HCA-7, HCT-116, HT-29, RKO, SW480) beschrieben, im Gegensatz zu der genamplifizierten Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3⁶⁸. Wie es auch bekannte Unterschiede zwischen den Tumorentitäten Brust und Magen gibt, könnte hier ein entscheidender Unterschied zum kolorektalen Karzinom bestehen.

Um der Notwendigkeit einer Validierung per FISH zu entgehen und eventuell falsch-positive Fälle bei einem IHC Score 2+ auszuschließen, entschieden wir uns für weitere Untersuchungen alleinig die hochexprimierenden Score 3+ Tumore heranzuziehen.

4.2. Das HER2/neu-Expressionsprofil

4.2.1. HER2/neu auf benignem mukösem Referenzgewebe

Die HER2/neu-Expression wurde neben den malignen Geweben auch auf der gesunden tumorfernen und wenn vorhanden tumornahen Dickdarmschleimhaut untersucht. Dabei fanden wir heraus, dass immerhin 13,5% (12/89) mit dem Klon 4B5 inkubierten Mukosaproben das Antigen HER2/neu in mäßiger Intensität exprimierten (siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.1., Seite 41 und **Tabelle 25**, Seite 46). Die spezifische membranöse Färbung wurde bevorzugt in den basalen Kryptenanteilen beobachtet, wohingegen eine granuläre unspezifische Färbung ausschließlich in den luminal gelegenen Kryptenzellen lokalisiert wurde. Die benigne kolorektale Schleimhaut wird in der Literatur und den meisten größeren Studien nicht erwähnt. Nur wenige Publikationen die darauf eingehen zeigen unterschiedliche Ergebnisse: einige Arbeitsgruppen kommentieren kurz in einem Nebensatz, dass keine HER2/neu-Expression^{61,63,64} oder Genamplifikation⁶⁴ auf dem benigne Gewebe

gefunden wurde. Andere hingegen beschreiben, vergleichbar mit unseren Erkenntnissen, einen positiven HER2/neu-Nachweis: Kapitanovic et al., 1997 fanden in 17,2% der Dickdarmmukosae eine positive HER2/neu-Färbung bei mäßiger Intensität (allerdings Gesamtpositivität, nicht ausschließlich spezifisch membranös)⁵⁹. Antonacopoulou et al., 2008 fanden 6,9% der mituntersuchten benignen Mukosa schwach membranös HER2/neu-positiv¹²⁵. Seo et al., 2014 beschreiben eine schwache und geringfügige membranöse HER2/neu-Expression im gesunden Kolonepithel⁶⁹. Half et al., 2004 beobachteten eine durchgängige zytoplasmatische Färbung der Epithelzellen des oberflächlichen Kryptenkompartimentes nahe der luminalen Oberfläche, Bereich in dem keine Zellproliferation stattfindet und der Differenzierungsgrad der Zellen hoch ist⁶⁸. Diese Erkenntnis hatten auch D’Emilia et al., 1989, die eine HER2/neu-Positivität ausschließlich an oberflächlichen luminalen Mukosazellen bei stets negativen Epithelzellen der Krypte fanden¹²⁶. Unsere Ergebnisse hingegen zeigten, neben der oberflächlichen luminalen unspezifischen HER2/neu-Färbung, eine spezifische membranöse Expression in den basalen Kryptenabschnitten mit reichlicher Zellproliferation (eigene Untersuchungen zeigten, Konform zur Literatur¹²⁷, den Proliferationsmarker Ki67 ausschließlich in den basalen Kryptenzellen exprimiert; signifikante Korrelation mit $p=0,010$ siehe **Tabelle 32**, Seite 54 sowie Abschnitt 4.3., Seite 87), welche somit gut zu erklären wäre.

Setzt man die Ergebnisse der Mukosa und dem autologen Primärtumor nebeneinander, so sieht man eine Zunahme der HER2/neu-Expression vom benignen zum malignen Gewebe in 7 von 12 Fällen. Interessanterweise zeigten sich allerdings die restlichen 5 von 12 positiven Mukosaproben mit einer höheren HER2/neu-Expression als der entsprechende autologe Primärtumor (**Tabelle 27**, Seite 48). Eine vergleichbare Beobachtung machten wir bei der Untersuchung der tumornahen Mukosa, die in 16 Fällen von 89 (18,0%) zusätzlich vorhanden war. In einem Fall war diese, wie bereits tumorfern erwähnt, an der Kryptenbasis zu 95% der Epithelzellen spezifisch membranös mit Score 3+ HER2/neu-positiv, wohingegen das entsprechende Karzinom nur 20% positive Zellen mit Score 2+ vorwies. Die übrigen 15 Fälle tumornaher Mukosa zeigten diese unauffällig HER2/neu-negativ. Half et al., 2004 fanden keinen Unterschied zwischen tumorferner und -naher Schleimhaut⁶⁸. Aber auch Kapitanovic et al., 1997 fanden bei 2,6% der Fälle eine mäßige Gesamtfärbung der tumornahen Mukosa⁵⁹, D’Emilia et al., 1989 beschrieben sogar eine ausgedehntere Kryptenfärbung als bei der tumorfernen Mukosa¹²⁶. Valtorta et al., 2015 publizieren sogar eine durchgängige

spezifische Epithelzellfärbung in hoher Färbeintensität der benignen Kolonmukosa, leider ohne genauer darauf einzugehen⁸⁴.

Betrachtet man die HER2/neu-Expression in benignen kolorektalen Läsionen, so findet man ebenso eine Zu- als auch Abnahme des HER2/neu-Nachweises im Vergleich zu Malignomen. Ein zufällig unter den untersuchten Patientenproben befindliches villöses Adenom (welches im Verlauf aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurde), zeigte keinerlei HER2/neu-Nachweis (Färbedaten nicht aufgeführt). Allerdings untersuchten Kapitanovic et al., 1997 Gewebeproben, worunter Polypen ausschließlich luminal und Adenome als Dysplasie bereits an der gesamten Krypte HER2/neu exprimierten. Jedoch wird auf den signifikant höheren HER2/neu-Nachweis in Adenokarzinomen hingewiesen⁵⁹. Widersprüchlich dazu ist die Publikation von Porebska et al., 2000: die behauptet eine häufigere HER2/neu-Expression in gutartige Adenome als in Karzinomen kolorektaler Herkunft (87% versus 54%) erhoben zu haben, wobei die Auswertmethode der Studie leider unklar bleibt¹²⁸. D'Emilia et al., 1989 beschreiben ihrerseits ebenfalls eine hohe Prozentanzahl stark positiver HER2/neu-exprimierender Polypen und stellten somit einen Zusammenhang zwischen HER2/neu-Überexpression und Präkanzerosen fest¹²⁵.

Die erhobenen Daten sprechen also sowohl für eine Hoch- als auch Herunterregulierung des HER2/neu-Proteins vom benignen zum malignen Gewebe. Eine Überexpression an HER2/neu in frühen Stadien kolorektaler Neoplasien ist im Rahmen der Karzinomentstehung (Adenom-Karzinom-Sequenz¹²⁹) sehr gut möglich, wenngleich nicht der primäre Faktor¹²⁶.

Ansonsten konnte eine signifikante Korrelation zwischen der HER2/neu-Expression im kolorektalen benignen Mukosagewebe und Primärtumor gesehen werden, sowohl beim HER2/neu-Nachweis als auch bei der Färbeintensität (**Tabelle 28**, Seite 50). Das HER2/neu-Vorhandensein sowie die Überexpression (definiert als Score 3+) in der Kolonmukosa stehen jeweils im statistisch nachgewiesenen Zusammenhang mit einem positiven HER2/neu-Status des Tumors ($p=0,028$) und dessen Überexpression (Score 3+, $p=0,020$).

Fraglich bleibt ob ein HER2/neu-Nachweis in der gesunden kolorektalen Schleimhaut bereits ein Indiz auf eine Karzinomentstehung geben kann. Hierzu wären Studien anhand endoskopisch erhobener Mukosaproben, zum Beispiel im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung, und dem Gesundheitsverlauf des Patienten aufschlußreich.

4.2.2. HER2/neu beim primären kolorektalen Karzinom

Das HER2/neu-Antigen wurde in 39 von 89 (43,8%) der untersuchten kolorektale Primärtumoren nachgewiesen. Darunter befanden sich 7 (von 39, sprich 17,9%) mit einer kompletten zirkulären Membranfärbung, wie sie nach den Brustkrebs-Auswertkriterien (BCSS) verlangt wird. Wenn positiv, zeigte sich meist nur ein kleiner Anteil des Karzinoms HER2/neu-positiv, wie der Median der Prozentzahl positiver Tumorzellen auf dem Objektträger von lediglich 16,6% beschreibt (Streubreite von 1% bis 85% spezifisch positiver Karzinomzellen). Bei der Färbeintensität überwog der Score 2+ in 56,4% der Fälle (22/39), der therapierelevante Score 3+ wurde bei einem Drittel (13/39, 33,3%) des positiven Kollektivs festgestellt (siehe **Tabellen 24** und **25**, Seite 46).

Unseren Auswertkriterien zufolge, fanden wir bei knapp 44% der Patienten einen spezifischen HER2/neu-Nachweis, beweisend dass dieses therapierelevante Antigen beim kolorektalen Karzinom vorhanden ist. Bei einem Drittel an HER2/neu-positiv getesteten Patienten wurde der höchste Score 3+ vergeben, welcher per se eine Indikation zur Trastuzumab-Therapie stellt (siehe Einleitung: **Abbildung 1**, Seite 4). Nach den Mammakarzinomrichtlinien (BCSS) wäre jedoch keine HER2/neu-Expression im kolorektalen Karzinom vorhanden.

In der Literatur lassen sich einige Studien finden, in denen die Expression von HER2/neu im kolorektalen Karzinom untersucht wurde. Die Übersicht der Publikationen bietet untenstehende **Tabelle 36**. Darin wird die weite Streubreite von 1,6% bis 47,4% HER2/neu-positiv beschriebener kolorektaler Karzinome ersichtlich, wobei auf zum Teil grundlegende Unterschiede der einzelnen Studienmodelle hingewiesen werden muss (insbesondere Antikörperauswahl und Auswertung). Stellt man unsere Daten gegenüber, so sieht man eine gute Konkordanz zu den publizierten Ergebnissen (siehe auch **Tabelle 35**, Seite 66).

Diskussion

Autoren, Jahr	n	Antikörper	Auswertung	% HER2/neu- Nachweis	Score-Verteilung
Lazaris et al. ¹³⁰ , 1995	60		membranös	35	
Ramanathan et al. ⁵⁸ , 2004	138			8	
Ooi et al. ⁶⁵ , 2004	244	polyclonal antibody*	membranös	3	1+ <i>als negativ gewertet</i> 2+ 2/8 (25%) 3+ 6/8 (75%)
Half et al. ⁶⁸ , 2004	96	e2-4001B5	membranös	5,2	3+ 5/5 (100%)
Essapen et al. ¹⁰⁸ , 2004	170	HM64.13	membranös	41	
Kountourakis et al. ⁸⁹ , 2006	106		membranös	5,66	
Schuell et al. ⁹⁵ , 2006	77	HercepTest® (A0485)	nach Mamma	30	1+ 20/23 (87%) 2+ 1/23 (4,3%) 3+ 2/23 (8,7%)
Park et al. ⁶¹ , 2007	137	polyclonal rabbit*	nach Mamma	47,4	1+ <i>als negativ gewertet</i> 2+ 38/65 (58,5) 3+ 27/65 (41,5%)
Pavakis et al. ⁸⁸ , 2007	106	NCL-CB11	nach Mamma	5,6	1+ 0 (0%) 2+ 3/6 (50%) 3+ 3/6 (50%)
Antonacopoulou et al. ¹²⁵ , 2008	124	F-11	membranös	27,4	
Kavanagh et al. ⁶³ , 2009	132	4B5	nach Mamma	13,6	1+ 7/18 (38,9%) 2+ 9/18 (50%) 3+ 2/18 (11,1%)
Marx et al. ⁶⁶ , 2010	1439	HercepTest® (A0485)	nach Magen	2,7	1+ <i>als negativ gewertet</i> 2+ 12/39 (30,8%) 3+ 27/39 (69,2%)
Kruszewski et al. ⁶⁷ , 2010	202	A0485	eigen, membranös	26,7	1+ 60/155 (38,7%) 2+ 64/155 (41,3%) 3+ 31/155 (20,0%)
Seo et al. ⁶⁹ , 2014	539	4B5	nach Magen	5,9	1+ <i>als negativ gewertet</i> 2+ 19/32 (59,4%) 3+ 13/32 (40,6%)
Ingold Heppner et al. ¹³¹ , 2014	1645	SP3	nach Magen	1,6	1+ 53/97 (54,6%) 2+ 35/97 (36,1%) 3+ 9/97 (9,3%)
Lee et al. ¹³² , 2014	94	HercepTest® (A0485)	nach Magen	16	1+ 15/30 (50%) 2+ 13/30 (43,3%) 3+ 2/30 (6,7%)
Styczen et al. ⁵⁵ , 2015	22	4B5	nach Magen	18,2	1+ 5/19 (26,3%) 2+ 13/19 (68,4%) 3+ 1/19 (5,3%)
Valtorta et al. ⁸⁴ , 2015	830	4B5	nach Magen, Cut-off >50% [#]	8,4	1+ 150/830 (18,1%) 2+ 37/830 (4,5%) 3+ 33/830 (4,0%)
Sartore-Bianchi et al. ¹⁰⁶ , 2016	914	4B5	nach Magen, Cut-off >50% [#]	5,3	1+ <i>als negativ gewertet</i> 2+ 7/27 (25,9%) [†] 3+ 20/27 (74,1%) [†]
Unsere Daten zum Vergleich	89	4B5	nach Magen, kein Cut-off	43,8	1+ 4/39 (10,3%) 2+ 22/39 (56,4%) 3+ 13/39 (33,3%)

Tabelle 36. Übersicht der Publikationen über die HER2/neu-Expression im kolorektalen Karzinom mittels Immunhistochemie mit Angabe der Prozentzahl der HER2/neu-Nachweishäufigkeit (Streubreite von 1,6% bis 47,4%, n=Fallzahl) und unsere Daten im Vergleich. Hellgrau hinterlegte Zellen konnten aufgrund mangelnder Information nicht ausgefüllt werden. * keine näheren Angaben im Originaltext. [#] nach *HERACLES Diagnostic Criteria*⁸⁴ (siehe 4.1.3., Seite 65). [†] Studienkollektiv (Subpopulation des positiven Kollektivs).

Welche Auswertkriterien nun für das kolorektalen Karzinom zur Anwendung kommen sollten ist aktuell nicht definiert. Zur Entwicklung der Mammakarzinomkriterien (BCSS) wurden parallel die Immunhistologie und die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eingesetzt und demnach die Richtwerte (Cut-off positiver Zellen und das Scoring) zu ermitteln, schließlich wurden die Auswertkriterien anhand klinischer Studien im Verlauf bestätigt. Aufgrund vorgegebener biologischer Unterschiede zwischen dem Brustdrüsengewebe und der Magenschleimhaut und somit auch verschiedener Tumormorphologie wurden für das Magenkarzinom neue Auswertkriterien erstellt^{36,79} (siehe hierzu Abschnitt 4.1.3., Seite 65).

Das entsprechende Therapiepotential einer HER2/neu-Überexpression soll auch in weiteren Tumorentitäten des Gastrointestinaltraktes gezeigt werden. Zwischen den Lokalisationen bestehen jedoch weitläufige Unterschiede. Gemäß der aktuellen Literatur, konnte in Ösophaguskarzinomen eine HER2/neu-Nachweishäufigkeit bis zu 17% beobachtet werden^{17,118,122,133,134}. Allerdings divergierten unter den Arbeitsgruppen die Auswertkriterien der Immunhistologie zwischen den Mamma- und Magenkarzinom-Richtlinien, wobei mittlerweile bekannt ist, dass hier Letztere zum Einsatz kommen sollte¹³³. Eine HER2/neu-Expression im Ösophaguskarzinom stand jedoch in keiner Korrelation mit klinisch-pathologischen Eigenschaften^{118,135,136}. Im Magenkarzinom wird eine HER2/neu-Nachweishäufigkeit zwischen 6% und 43% beschrieben^{17,36,137}. Während HER2/neu mittlerweile im oberen Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle als Therapieansatz spielt, wurde in Karzinome des Dünndarms kein nennenswerter Nachweis einer HER2/neu-Überexpression entdeckt: eine US-amerikanische Arbeitsgruppe untersuchte nach Mammakarzinom-Kriterien die HER2/neu-Präsenz auf Karzinome verschiedener Dünndarmanteilen. Nur in 4% des Untersuchungskollektivs wurde in geringer Intensität (Score 1+) überhaupt HER2/neu nachgewiesen¹³⁸. Weiter aboral, im kolorektalen Karzinom, scheint die HER2/neu-Expression wieder präsenter zu sein. Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse je nach Auswertung erheblich: zwischen 0% und 83% wird der HER2/neu-Nachweis in der Literatur beziffert^{47,95}. Wurde die membranöse HER2/neu-Expression untersucht, so findet man eine Nachweishäufigkeit von 0% bis etwa 48%^{47,61}. Im isoliert untersuchten Rektumkarzinom konnte eine Arbeitsgruppe aus Göttingen einen positiven HER2/neu-Status in 12% beziehungsweise 27% der untersuchten Biopsien und Resektate feststellen¹³⁹. Diese Erkenntnisse aus den anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes

zeigen, dass neben dem Brustdrüsengewebe auch andere Entartungen von Magen-Darm-Epithelien HER2/neu überexprimieren, wengleich daraus ersichtlich wird wie wichtig die Anwendung angepasster Auswertkriterien ist.

Eine bekannte Eigenschaft der kolorektalen Karzinome ist die Tumorheterogenität¹⁴⁰, somit auch in ihrer HER2/neu-Expression. Auch in unseren Daten zeigt sich diese durch eine meist geringe Prozentzahl positiver Tumorzellen im Präparat (Median von nur 16,6%). Marx et al., 2010 erkannten dies als Problem und führen das bisherige Scheitern einer Trastuzumab-Therapie beim kolorektalen Karzinom darauf zurück⁶⁶. Andere Tumorentitäten wie das Mamma-, Magen- oder Ösophaguskarzinom, bei denen eine selektive HER2/neu-Rezeptorbindung durch Trastuzumab ein Erfolg zeige, seien in Ihrer Rezeptorexpression homogen^{66,141,142}. Des Weiteren erklärten die Wissenschaftler die *Tissue Microarray*-Methode, in der bis zu ein Tausend in Paraffin eingebetteten Gewebestücke pro Objektträger gleichzeitig untersucht werden können, durch die Heterogenität als nicht geeignet⁶⁶. Die Aussagekraft einer HER2/neu-Expression auf einer solch kleinen Tumorfläche ist zu gering. Bestätigend sind hierfür Studien, die ausschließlich diese Methodik anwandten und dabei nahezu keine HER2/neu-Expression im Kolonkarzinom fanden^{70,143}. Einen möglichen Lösungsansatz entwickelten Stahl et al., 2015 mit einem *heterogeneity tissue microarray*, der im Schnitt bis zu acht unterschiedliche Tumorareale darstellt und somit das Problem umgeht: in ihrem untersuchten Kollektiv zeigte sich eine Heterogenität bei 88,9% der Tumore¹⁴⁴.

Vielversprechend zeigte sich eine klinische Studie mit Trastuzumab beim kolorektalen Karzinom bereits im Jahre 2004⁵⁸: Ramanathan et al. untersuchten anhand des HercepTest® kolorektale Karzinome auf ihren HER2/neu-Status und therapierten die geeigneten Patienten mit einer wöchentlichen intravenösen Gabe von Trastuzumab in Kombination mit Irinotecan über 6 Wochen. Eingeschlossen wurden Patienten mit Score 2+ oder 3+ HER2/neu-positiven Karzinom (anhand der Brustkrebs-Auswertung), unabhängig von einer mittels FISH erhobenen Genamplifikation. Die Arbeitsgruppe fand in 11 von 138 Karzinomen (=8,0%, 5 Score 2+ und 6 Score 3+) einen HER2/neu-Nachweis, worunter 9 Patienten in die Studie aufgenommen wurden. In 5 von 7 aussagekräftigen Fällen (=71,4%), konnte ein partielles Ansprechen auf die Chemotherapie beobachtet werden: definiert wurde dieses durch den

Rückgang von über 50% der Ausgangstumormasse (radiologisch ausgemessen und kontrolliert). Leider wurde die Studie vorzeitig wegen stark verzögerter Patientenrekrutierung beziehungsweise sehr geringer Indikationsstellung (nur 8% des Kollektivs) beendet. Die Autoren sahen dadurch nur ein limitiertes Potential für die weitere Forschung, schlossen jedoch den Einsatz von Trastuzumab beim kolorektalen Karzinom damit nicht aus⁵⁸. Ein weiteres Beispiel auf einen positiven Effekt von Trastuzumab beschrieb der Kliniker Sorscher aus Washington (2011): in seiner Fallvorstellung erklärte er ein Ansprechen eines metastasierten HER2/neu-positiven Rektumkarzinom auf Trastuzumab¹⁴⁵. Ein weiterer erfolgreicher Fall (Case Report von Disel et al., 2015) wird bei einer therapieresistenten Patientin mit pulmonal metastasiertem Kolonkarzinom berichtet: die untersuchte Lungenmetastase erwies sich HER2/neu-positiv (genaue histologische Methode nicht erwähnt) und sprach auf eine Kombination von Trastuzumab und Standardtherapeutika (Capecitabin [Vorstufe von 5-Fluorouracil] mit Oxaliplatin) an¹⁴⁶.

Die Fallbeispiele zeigen, dass eine Trastuzumab-Therapie beim HER2/neu-positiven kolorektalen Karzinom durchaus erfolgsversprechend sein kann. Dieser Ansicht sind auch Nazemalhosseini et al., 2013 sowie Schuell et al., 2006 in ihren Schlußfolgerungen^{45,95}. Dies unterstreicht umso mehr die Notwendigkeit einer gut überlegten und standardisierten Patientenstratifizierung für eine anti-HER2/neu basierte Therapie.

Aktueller und immer wichtiger erscheinen in den letzten Jahren die Ansätze einer dualen Antikörpertherapie, bei der eine gleichzeitige parallele Antigenbindung mit einem Antikörper (zum Beispiel Lapatinib als dualer EGFR- und HER2/neu-Tyrosinkinaseinhibitor, siehe Einleitung: Abschnitt 1.2, Seite 2 und **Abbildung 2**, Seite 7) möglich ist oder in Form einer Kombination zweier bekannter Antikörperpräparate. Erste Erkenntnisse wurden diesbezüglich anhand Kolonkarzinomzelllinien gesammelt^{147,148}. Zum Beispiel wurde eine anti-HER2/neu-Therapie ausschließlich an Zellen mit EGFR(HER1)-vermittelter Zellproliferation gesehen, eine gleichzeitige Inhibition von HER2 und EGFR zeigte messbar größere Tumornekroseareale¹⁴⁷. Andere Kombinationen zeigten Wirkung in Form einer Herunterregulierung von EGFR und HER2 (Lapatinib mit Gefitinib [EGFR-Inhibitor] in der kolorektalen Karzinomzelllinie Caco-2)¹⁴⁸. Eine parallele Therapie von Lapatinib und Irinotecan konnte an Magen- und Kolonkarzinomzelllinien eine Inhibition der Zellproliferation zeigen¹⁴⁹. Zunächst konnte klinisch jedoch in einer 2012 publizierten Studie kein Erfolg gezeigt werden: Frank et al. untersuchten den Einsatz von Lapatinib in

Kombination mit einer Capecitabine-Therapie (5-Fluorouracil-basierte Chemotherapie) an fortgeschrittenen und rezidivierenden kolorektalen Karzinomen. Ein Ansprechen wurde bei keinem der 29 therapierten Patienten festgestellt¹⁵⁰. Einen positiven klinischen Effekt einer Kombination zweier anti-HER2/neu-Therapeutika (Trastuzumab und Pertuzumab, ein rekombinanter humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper mit Bindung an die extrazelluläre Dimerisierungsdomäne des HER2, siehe Einleitung: Abschnitt 1.2, Seite 2 und **Abbildung 2**, Seite 7) wurde jedoch bereits 2010 beim Mammakarzinom erwiesen¹⁵¹.

Hochaktuell zeigt sich unterdessen die bereits obenerwähnte Phase II-Studie HERACLES (für *HER2 Amplification for Colo-rectal Cancer Enhanced Stratification*)^{106,152}, die sich mit der Erprobung einer dualen anti-HER2/neu-Therapie durch Einsatz von Trastuzumab in Kombination mit Lapatinib oder Pertuzumab befasst¹⁰⁶. Das Studiendesign basiert auf einer Entdeckung der leitenden Arbeitsgruppe um Bertotti et al.¹⁴⁰, die bereits im Jahr 2011 anhand eines tierexperimentellen Modells mit Xenografts eine vermehrte HER2/neu-Expression in Cetuximab-resistenten kolorektalen Tumore (sprich KRAS-Wildtyp) entdeckten. Diese wurden im Verlauf mit einer dualen anti-HER2/anti-EGFR-Therapie (Lapatinib und Cetuximab bzw. Pertuzumab) behandelt, wodurch eine Tumorregression von respektive 41% und 75% erzielt werden konnte. Damals erklärten die Wissenschaftler HER2/neu als Prädiktor einer Cetuximab-Resistenz sowie dualen Therapie mit Trastuzumab¹⁴⁰. Ob sich diese Erkenntnis auch klinisch in vivo im menschlichen Organismus bestätigen lassen und eine duale Antikörpertherapie beim kolorektalen Karzinom effektiv ist, liefern aktuelle Daten aus der besagten HERACLES-Studie¹⁰⁶: dessen Auswertkriterien, von den Forschern selbst *HERACLES Diagnostic Criteria* genannt, wurden klar definiert, validiert und publiziert (siehe Abschnitt 4.1.3., Seite 65)⁸⁴. Zuletzt wurde im Oktober 2015 der erste definierte Endpunkt der Studie erreicht: bei 8 von 27 eingeschlossenen und mit Trastuzumab und Lapatinib therapierten Patienten (welche eine Tumorprogression unter herkömmlichen Chemotherapien und etablierten Antikörper erlitten) konnte ein objektives Ansprechen festgestellt werden (verlängerte progressionsfreie Zeit von 24 bis 94+ Wochen, medianes Gesamtüberleben 46 Wochen, 95% Konfidenzintervall, 33-68%). Von den 8 auf die Therapie ansprechenden Patienten wiesen 7 einen Score 3+ positiven Tumor in der Immunhistochemie auf (nach *HERACLES Diagnostic Criteria*⁸⁴). Auch wenn von insgesamt 914 in die Studie eingeschlossenen Patienten überhaupt nur 48 als HER2/neu positiv befundet wurden (=5,3%) und von 27 therapierten nur 8 ein Ansprechen zeigten (=29,6%, entsprechen

0,9% des Gesamtkollektivs) so sehen die Wissenschaftler HER2 als prädiktiver Faktor beim kolorektalen Karzinom^{84,106}.

4.2.3. HER2/neu auf kolorektalen Lebermetastasen

Bei 58 untersuchten kolorektalen Lebermetastasen konnte in 24 Fällen (41,4%) das HER2/neu-Antigen nachgewiesen werden. Drei der 24 Lebermetastasen (12,5%) zeigten eine komplette zirkuläre membranöse Färbung, die Hälfte der positiven Fälle (12/24, 50%) zeigten einen therapielevanten Score 3+, die übrigen einen Score 2+ (11/24, 45,8%) und nur eine den niedrigen Score 1+ (4,2%).

Im direkten Vergleich zum Kollektiv der kolorektalen Primärtumore, zeigen sich die Zahlen der Nachweishäufigkeit sowie Prozentsatz positiver Zellen und deren Median nahezu gleich (41,4% versus 43,8% bei den Primärtumoren, Median jeweils 16,6%; siehe **Tabelle 25**, Seite 46). Auffallend ist jedoch der deutlich höhere Anteil an stark positiven und mit Score 3+ befundenen Lebermetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren (33,3% versus 50%) mit statistischer Signifikanz ($p=1,21 \times 10^{-5}$, siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.4., Seite 45).

Die in vier Fällen vorhandenen synchronen autologen Lebermetastasen verhielten sich allerdings hinsichtlich einer HER2/neu-Expression nahezu identisch zum Primärtumor, lediglich eine Lebermetastase exprimierte HER2/neu bei einem leicht positiven Primarius (5% positiver Tumorzellen, Score 2+) nicht (siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.6. und **Tabelle 29**, Seite 50).

Unsere Daten zeigen also, dass auch im metastasierten kolorektalen Karzinom eine HER2/neu-Expression im vergleichbaren Ausmaß zum Primärtumor vorhanden ist, selbst unter Anwendung der strengeren Auswertkriterien nach dem Mamma- oder Magenkarzinom (respektive 12,5% und 20,7%, **Tabelle 24** und **26**, Seiten 46 und 47). Bei der Hälfte aller positiv getesteten an Lebermetastasen erkrankten Patienten wäre eine anti-HER2/neu-Therapie demnach indiziert. Die Untersuchung der vier wenigen synchronen Lebermetastasen zeigte keine Steigerung oder Verlust der HER2/neu-Expression zur Metastase, was oben genannte Beobachtung bestärkt.

In der Literatur gibt es wenige Publikationen über HER2/neu in kolorektalen Metastasen. Vereinzelt untersuchten Arbeitsgruppen parallel zum Primärtumor zusätzlich eine geringe Anzahl an vorhandenen Karzinomfiliae. Nathanson et al., 2003 untersuchten 15 Lebermetastasen auf HER2/neu (mit HercepTest®, Mammakarzinom-Auswertung) und

fanden bei einer (1/15, 7%) eine Überexpression⁶⁴. Half et al., 2004 beschrieben an ihrem Kollektiv (n=25) eine Zunahme der Inzidenz stark positiver membranöser Färbung (Score 3+) vom Primärtumor zur Lebermetastase: während nur 5% der Primärtumore Score 3+ erhielten, waren es 12% der Lebermetastasen. Auch der mRNA-Spiegel aus HER2/neu war in den Lebermetastasen höher vorgefunden worden als in den Primaria, synchrone autologe Metastasen zeigten jedoch ähnliche Werte als der Primärtumor⁶⁸. Wei et al., 2011 fanden keinen HER2/neu-Nachweis bei 10 untersuchten synchronen Lebermetastasen bei allerdings auch vollständig negativen Primärtumoren (HercepTest®)¹⁵³.

Seo et al., 2014 untersuchten zwar keine Metastasen, bildeten jedoch für ihre Studie zwei Kohorten an erkrankten Patienten mit der Unterteilung in kolorektalem Karzinom einerseits und fortgeschrittenem Tumorstadium mit synchronen sowie metachronen Fernmetastasen andererseits. Die Wissenschaftler fanden den HER2/neu-Nachweis in beiden Kohorten nahezu gleich und konnten keinen Unterschied feststellen⁶⁹.

Eine Studie von Lee et al., 2014 beschrieb den HER2/neu-Status in kolorektalen Metastasen im Vergleich zum Primärtumor¹³²: die koreanischen Wissenschaftler untersuchten insgesamt 88 Leber- sowie sechs Lungenmetastasen; nachteilig, es wurden beide Lokalisationen zusammengefaßt und nicht getrennt aufgeführt. Ein positiver HER2/neu-Status wurde bei 9 von 94 Metastasen festgestellt (=9,6%, HercepTest®, exakte Auswertung nach Magenkarzinomrichtlinien inklusive weiterer Untersuchung bei IHC Score 2+ durch FISH). In 70,2% (66/94) der Fälle waren der HER2/neu-Score im Primärtumor und der Metastase identisch; in 28 Fällen (29,8%) bestand eine Diskrepanz, worunter jedoch nur 4 Fälle (4,3%) mit völliger Gegensätzlichkeit (Score 0 versus Score 3+). Insgesamt schlussfolgerten die Forscher ebenso, dass die HER2/neu-Regulation während der Metastasierung bestehenbleibt¹³².

Zuletzt publizierten Styczen et al., 2015 Ergebnisse ihrer HER2/neu-Forschung auf kolorektale Lebermetastasen: in 8,2% des Kollektivs konnte das Antigen nachgewiesen werden (methodisch erfolgte die Auswertung nach den Magenkarzinomrichtlinien mittels Paraffinhistologie mit dem Klon 4B5 und *In-Situ*-Hybridisierung)⁵⁵. Dabei wurde ebenso wie beim kolorektalen Primärtumor eine hohe Heterogenität positiver Karzinomzellen im Tumorgebiet von 75% beobachtet. Interessanterweise waren vermehrt Lebermetastasen aus Kolonkarzinomen HER2/neu positiv als Lebermetastasen rektalen Ursprungs (12,1% vs. 6,3%). Im Gegensatz zu unseren synchronen Lebermetastasen (n=4), konnte in dieser Studie

keine Konkordanz der Ergebnisse zwischen den synchronen positiven Lebermetastasen und den Primärtumoren (bei einem verminderten Kollektiv von n=22) gefunden werden (siehe unten).

Zum weiteren Verständnis des HER2/neu-Status in der metastasierten Situation kann der Antigennachweis in Lymphknotenmetastasen interessant sein. Einige Arbeitsgruppen untersuchten vorhandene Lymphknotenmetastasen kolorektaler Tumore: Kapitanovic et al., 1997 analysierten Lymphknotenmetastasen HER2/neu-überexprimierender Primärtumore und fanden in allen Fällen HER2/neu-exprimierende Zellen, ob im Konglomerat oder auch nur vereinzelt (keine Angabe über Fallzahl, keine detaillierte Ergebnisdarstellung)⁵⁹. Gleiches fanden Ooi et al., 2004: bei allen vorhandenen Lymphknotenmetastasen HER2/neu-positiver Primärtumore konnten überexprimierende Karzinomzellen gesehen werden (n=13, keine detaillierte Ergebnisdarstellung)⁶⁵. Leung et al., 2008 konnten bei keiner der untersuchten Lymphknotenmetastasen (0/47) eine HER2/neu-Expression beobachten, wobei die Nachweishäufigkeit im Primärtumor ebenfalls nahezu null war (1/119, HercepTest®)⁷⁰. Gleiches publizierten Wei et al., 2011 als von 55 untersuchten Primaria und deren synchronen Lymphknotenmetastasen sich lediglich ein Paar HER2/neu-Score 3+ positiv zeigten (HercepTest®)¹⁵³. Der Literatur zufolge, kann also von einer gleichwertigen HER2/neu-Expression zwischen kolorektalem Primärtumor und Lymphknotenmetastase ausgegangen werden.

Interessanterweise fanden Schuell et al., 2006 jedoch isoliert bei kolorektalen Tumoren der UICC-Stadien III und IV (sprich im bereits lymphogen- oder fernmetastasierten Zustand) eine HER2/neu-Expression⁹⁵, was durchaus als metastasenfördernder Faktor gewertet werden kann. Eine statistische Korrelation bestand jedoch nicht⁹⁵ (siehe Abschnitt 4.3., Seite 87). Diesen Gedanken jedoch unterstreicht die Aussage von Kapitanovic et al., 1997, die bei initial metastasenfremen HER2/neu-positiven Primärtumorpatienten eine Metastasenentwicklung im Verlauf dokumentierten (Auswertung bezog sich auf Gesamtfärbung, nicht ausschließlich membranös)⁵⁹. Dies deckt sich auch mit unserer Beobachtung an den wenigen synchronen Lebermetastasen, dass die HER2/neu-exprimierenden Leberfiliae auch einen positiven Primärtumor zugrunde haben.

Auch in anderen Tumorentitäten ist die HER2/neu-Expression zwischen dem Primärtumor und den Metastasen vergleichbar. Beim Mammakarzinom ist die HER2/neu-Expression von der Tumorprogression bis zur Fernmetastase erhalten^{17,154}. Ebenso beim Ösophaguskarzinom konnte eine hohe Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastasen gemischter Lokalisationen gesehen werden¹⁴². Beim Magenkarzinom ist der HER2/neu-Nachweis vergleichbar im Tumor wie in den Lymphknoten- und Fernmetastasen, sogar teilweise identisch^{141,155}.

Leider wurde in den erwähnten Studien über kolorektale Metastasen nie auf eine mögliche vorausgegangene Therapie des Patienten eingegangen. Ein Unterschied zwischen bereits vortherapierten und nicht behandelten kolorektalen Metastasen machten die Wissenschaftler nicht. Unser Kollektiv wurde hinsichtlich einer vorausgegangenen Therapie geprüft, wobei untherapierte Patienten sowie lediglich eine frühere medikamentöse Therapie des Primärtumors zulässig war (neoadjuvante Chemotherapie, Strahlentherapie oder Ablatio waren Ausschlußkriterien, siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.1., Seite 25). So bekamen Patienten von metachron untersuchten Lebermetastasen teilweise eine medikamentöse Chemotherapie gegen den kolorektalen Primärtumor zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung. Sowohl bei der HER2/neu-Nachweishäufigkeit als auch bei der Score-Verteilung konnte kein statistischer Unterschied zwischen Lebermetastasen von im Voraus behandelten versus unbehandelten Patienten gesehen werden (siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.3., Seite 43 und **Tabelle 22**, Seite 44). Eine statistisch signifikante Korrelation bestand zwischen den zwei Gruppen ebenso nicht (**Tabelle 23**, Seite 45).

Schließlich besteht kein nennenswerter und statistischer Unterschied in der Häufigkeit der HER2/neu-Expression zwischen kolorektalen Primärtumoren und Lebermetastasen, wie bereits aus den anderen Tumorentitäten bekannt ist. Beachtlich ist jedoch der deutlich statistisch signifikant höhere Anteil an starker Expression (Score 3+) bei HER2/neu positiven Lebermetastasen, was auch unabhängig von Half et al., 2004 beobachtet wurde⁶⁸. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese das HER2/neu-Antigen häufiger in höherer Dichte exprimieren und damit im metastasierten Stadium eine anti-HER2/neu-Therapie häufiger indiziert wäre.

Eine Abweichung der HER2/neu-Expression vom Primärtumor zur Lebermetastase konnte an unseren wenigen Fällen nicht gesehen werden (n=4), jedoch ist eine fallbezogene Aussage

über die HER2/neu-Expression bei der Metastasierung bei dieser geringen Fallzahl nicht ausreichend möglich.

4.3. Korrelationen der HER2/neu-Expression mit klinisch-pathologischen Daten und ausgewählten Biomarkern sowie dessen tumorbiologischen Wertigkeit

Die erhobene HER2/neu-Expression wurde in Zusammenhang mit den wichtigsten klinischen und pathologischen Daten der Patienten gebracht um somit potentielle Patientensubgruppen zu identifizieren, welche besonders von einer anti-HER2/neu-Therapie profitieren würden.

Hinsichtlich der kolorektalen Primärtumore ergaben sich zwei signifikante Korrelationen (siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.7., Seite 51 und **Tabelle 30**, Seite 52).

Zum einen konnte ein Zusammenhang zwischen einer HER2/neu-Expression im kolorektalen Karzinom und dem Geschlecht gesehen werden: sowohl der HER2/neu-Nachweis als auch der hohe Score 3+ waren statistisch gesehen vermehrt beim weiblichen Geschlecht vertreten ($p=0,005$ und $p=0,014$ respektive). Diese Beobachtungen wurden, nach aktuellem Stand der Literatur, in bislang keiner Studie weder beim kolorektalen Karzinom noch bei anderen Tumorentitäten publiziert. Es stellt sich zurecht die Frage nach der Geschlechtsspezifität einer HER2/neu-Überexpression, wo doch das HER2/neu-Antigen vor allem mit dem Mammakarzinom, und somit weiblichen Geschlecht, assoziiert wird. Doch auch das seltene männliche Mammakarzinom (immerhin 1% aller Brustdrüsenmalignome) weist eine HER2/neu-Überexpression auf, jedoch interessanterweise aus noch unbekanntem Gründen epidemiologisch in geringerem Ausmaß als die weiblichen Variante¹⁵⁶. Möglich erscheint ein hormonspezifischer Zusammenhang, wobei keine Korrelationen des HER2/neu- mit dem Hormonrezeptorstatus (Östrogen oder Progesteron) nach aktueller Studienlage bekannt sind und zudem ein positiver Hormonrezeptorstatus beim männlichen Mammakarzinom häufiger vorliegt als beim weiblichen¹⁵⁶. Auch einen Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter der Patientinnen, und somit gegebenenfalls postmenopausalen Hormonhaushalt, konnte in unseren Ergebnissen nicht gezeigt werden: der Altersdurchschnitt sowie die Altersverteilung waren in beiden Gruppen (HER2/neu positiv vs. negativ) nahezu identisch (66 Jahre vs. 68 Jahre und Streubreite von 43 bis 83 Jahre vs. 51 bis 90 Jahre respektive), was allerdings bereits allein am Kollektiv liegen könnte. Geschlechterspezifisch zeigt sich der HER2/neu-Status beim Magenkarzinom übrigens ebenso nicht³⁶.

Zum anderen korrelierte die Tumorlokalisierung mit dem HER2/neu-Status: sowohl das Vorhandensein des Antigens als auch die stärkere Intensität (Score 3+) waren signifikant vermehrt im linken Kolonabschnitt (Colon descendens, Colon sigmoideum oder oberes Rektumdrittel) vorzufinden ($p=0,032$ und $p=0,002$ respektive). Letztere Beobachtung machten Seo et al. in der 2014 veröffentlichten Studie ebenso: sie fanden eine Korrelation zwischen einem positiven HER2/neu-Status und der Tumorlokalisierung im Rektum (gesamtes Rektum inbegriffen; höhere HER2/neu-Nachweishäufigkeit als im Kolon)⁶⁹. Interessanterweise wurde die linksseitige kolorektale Karzinomlokalisierung als prädiktiver Faktor für eine Cetuximab-Therapie erkannt wie von Einem et al., 2014 veröffentlichten¹⁵⁷. Anhand unserer Daten konnte jedoch bezüglich der Lokalisation im Rektum keine Korrelation zwischen dem oberen Rektumdrittel (entsprechend unseren Einschlusskriterien, siehe Abschnitt 3.1., Seite 25) und dem restlichen Kolon weder beim HER2/neu-Nachweis noch beim HER2/neu-Score gesehen werden ($p=0,290$ und $p=0,162$ respektive, Korrelationsdaten nicht aufgeführt). Eine relevante Aussage über eine höhere Expression im oberen Rektumdrittel im Vergleich zum Restkolon kann bei unserer geringen Fallzahl von $n=8$ schließlich nicht getroffen werden.

Die aktuelle Literatur über Korrelationen des HER2/neu-Status mit klinisch-pathologischen Daten ist widersprüchlich. Zahlreiche Arbeitsgruppen fanden keinen statistisch signifikanten Zusammenhang^{61,63,64,65,66,67,68,69,88,95,125,128,158,159}. Im Gegensatz dazu berichten Lazaris et al., 1995 über eine signifikante Korrelation zwischen der Häufigkeit einer membranösen HER2/neu-Expression und fortgeschrittene UICC-Stadien sowie einer schlechten Differenzierung und einer hohen Tumormitoseaktivität¹³⁰. Kapitanovic et al., 1997 fanden ebenfalls einen statistischen Zusammenhang zwischen einer mäßigen bis starken Intensität der HER2/neu-Tumorfärbung und UICC-Stadien III und IV⁵⁹. In der publizierten Studie von Ingold-Heppner et al., 2014 korrelierte die HER2/neu-Positivität mit einem höheren UICC-Stadium (III und IV) sowie positiven Lymphknotenstatus (pN1)¹³¹. Letzteres beschrieben jüngst auch Pyo et al., 2016, die eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer HER2/neu-Überexpression und Lymphknoten- sowie Fernmetastasen feststellten (entsprechend den UICC-Stadien III und IV)¹⁶⁰. Nur Kountourakis et al., 2006 beschrieben, konträr zu den gerade erwähnten Publikationen, eine Korrelation zwischen membranöser HER2/neu-Färbung und einem negativen Lymphknotenstatus (NO)⁸⁹.

Bei den HER2/neu-Daten der kolorektalen Lebermetastasen konnten keine Korrelationen gesehen werden (siehe **Tabelle 31**, Seite 53). Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Styczen et al.⁵⁵, weitere Literatur gibt es aktuell nicht.

Entgegen der bekannten Korrelation der HER2/neu-Überexpression und dem schlechten Differenzierungsgrad beim Mammakarzinom^{161,162,163} sowie des histologischen Tumortyps und dem HER2/neu-Status beim Magenkarzinom (HER2/neu vermehrt im intestinalen Tumortyp, welches mit einem hohen Differenzierungsgrad assoziiert ist)^{164,165,166}, ist es anzunehmen, dass es bei kolorektalen Primärtumore und korrespondierenden Lebermetastasen keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der HER2/neu-Expression und klinisch-pathologischen Parametern gibt. Abschließend wären jedoch großangelegte Multicenterstudien mit großer Patientenzahl für signifikante Ergebnisse notwendig.

Zusätzlich zu den klinisch-pathologischen Faktoren wurde der HER2/neu-Status mit verschiedenen tumorbiologisch relevanten Parametern im Karzinom sowie dessen Mikromilieu korreliert, die möglicherweise den HER2/neu-Status regulieren oder beeinflussen. Die Expression ausgewählter Biomarker für Leukozyteninfiltration und Immunsystemaktivierung (CD45 und HLA-DR), Zellproliferation (Ki67), sowie der EGFR aus der HER-Familie (HER1, siehe Einleitung: Abschnitt 1.3.1., Seite 5) wurden in Zusammenhang mit der HER2/neu-Expression gebracht.

Im kolorektalen Karzinom konnte ein Zusammenhang mit der Leukozyteninfiltration und dem Aktivierungsstatus der Karzinomzellen gesehen werden (siehe Ergebnisse: Abschnitt 3.3.8., Seite 53 und **Tabelle 33**, Seite 54): interessanterweise waren die HER2/neu-positiven Karzinome statistisch gesehen vermehrt HLA-DR negativ ($p=0,010$) und somit hinsichtlich einer Immunsystemreaktion nicht aktiviert; ein hoher HER2/neu-Score 3+ ging mit einer fehlenden oder geringen Leukozyteninfiltration im unmittelbar angrenzenden Bindegewebe einher ($p=0,037$). Die Daten belegen dadurch eine verringerte Leukozytenaktivität im tumornahen Mikromilieu und somit geringere Immunantwort im Karzinomgebiet, was durchaus den Karzinomzellen einen deutlichen Überlebensvorteil bringt. Richards et al., 2014 konnten eine starke Leukozyteninfiltration als positiv prognostischen Faktor erkennen¹⁶⁷; im Umkehrschluss ist eine fehlende Leukozyteninfiltration prognostisch ungünstig.

Korrelationen zwischen dem HER2/neu-Status in kolorektalen Lebermetastasen und den erwähnten Biomarkern gab es keine (siehe **Tabelle 34**, Seite 55).

Einen statistischen Zusammenhang mit dem verwandten HER1 (EGFR) konnte in allen Gewebearten nicht erhoben werden. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Saeki et al., die ebenfalls keine Korrelation beziehungsweise Coexpression von EGFR und erbB-2 im kolorektalen Karzinom fanden¹⁶⁸.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz ausgereifter Operationsverfahren und aggressiver Chemotherapeutika bleiben die Therapiemöglichkeiten beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom limitiert und teilweise wenig effektiv, die Rezidiv- und Metastasierungsrate nach wie vor hoch. Durch besseres Verständnis der Tumorbiologie konnten in den letzten Jahren, zusätzlich zu den klassischen Therapeutika, monoklonale Antikörper wie Cetuximab und Bevacizumab als Therapieoption im Sinne einer individualisierten Krebstherapie gewonnen werden. Daher ist es von großem Interesse, weitere neue prädiktive molekulare Biomarker als weitere Tumorangriffspunkte zu identifizieren. Aktuelle Behandlungsmethoden mit selektiver HER2/neu-Bindung mit Trastuzumab zeigen beim Mamma- sowie Magenkarzinom einen Therapieerfolg; die HER2/neu-Expression in weiteren Tumorarten wie das metastasierte kolorektale Karzinom ist aktuell noch nicht vollständig erforscht. Die Nachweishäufigkeit des Oberflächenrezeptors im kolorektalen Primärtumor wird in der aktuellen Literatur eher als gering angesehen: doch lassen sich die HER2/neu-Diagnostik sowie das Expressionsmuster in Mamma- und Magenkarzinom auf Malignome der Kolonschleimhaut übertragen? Könnte HER2/neu beim kolorektalen Karzinom und seinen Metastasen ebenfalls ein prädiktiver Marker sein?

In der vorliegenden Arbeit wurde das repräsentative Kollektiv von insgesamt 89 kolorektalen Primärtumoren und 58 kolorektalen Lebermetastasen auf eine HER2/neu-Expression hinsichtlich einer potentiellen anti-HER2/neu-Therapie mittels Kryoimmunhistologie untersucht. Hierfür wurden verschiedene Antikörperklone gegen das HER2/neu-Antigen eingesetzt und Nachweis- sowie Auswertverfahren nach Mamma- und Magenkarzinomrichtlinien verglichen. Statistische Zusammenhänge wurden mit den Ergebnissen des zugelassenen Antikörperklons 4B5 und den neuesten Auswertkriterien des Magenkarzinoms durchgeführt.

Methodisch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse zwischen den getesteten Antikörperklone sowohl bei der spezifisch membranösen als auch bei der unspezifischen Färbung. Anhand des Klones 4B5, konnte in 43,8% der kolorektalen Karzinome eine HER2/neu-Expression nachgewiesen werden, darunter sogar 14,6% mit einem Therapie-indizierenden Score 3+. Der HER2/neu-Nachweis in kolorektale Lebermetastasen war mit 41,4% vergleichbar mit dem Kollektiv der Primärtumore. Der Anteil an HER2/neu-

hochexprimierenden Lebermetastasen (Score 3+) lag jedoch mit 20,7% höher als der der Primärtumore. Auch die entfernte autologe gutartige Dickdarmmukosa war in 13,5%, wenn auch selten überexprimiert (2,2%), HER2/neu-positiv. Es wurde eine statistische Korrelation zwischen der HER2/neu-Expression in der Mukosa und dem Primärtumor gesehen. Die tumorangrenzende Schleimhaut verhielt sich unauffällig. Insgesamt fiel eine deutliche Tumorheterogenität auf. Vereinzelt untersuchte synchrone Lebermetastasen verhielten sich entsprechend dem Primärtumor. Es wurde kein Unterschied zwischen Lebermetastasen unbehandelter und vortherapierter Patienten gefunden. Es zeigten sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen der HER2/neu-Expression im Primärtumor und dem Geschlecht sowie der Tumorlokalisation; zudem bestand der Zusammenhang mit einer verminderten Immunreaktion. In der Kolonmukosa konnte ein statistischer Zusammenhang mit der Proliferation und der Leukozyteninfiltration entdeckt werden. Im Lebermetastasenkollektiv konnte keine Korrelation gesehen werden. Eine im Rahmen einer Kooperation untersuchten Subgruppe zeigte keine HER2/neu-Genamplifikation in allen drei Gewebearten.

Es konnte gezeigt werden, dass die immunhistochemische HER2/neu-Auswertung des Magenkarzinoms für das kolorektale Karzinom weitestgehend übernommen werden kann. Eine Subpopulation an kolorektalem Karzinom erkrankten Patienten, insbesondere Frauen, Patienten mit linksseitiger Tumorlokalisation oder mit einem geringen Leukozyteninfiltrat im Primärtumor, überexprimierte das Antigen im Primärtumor oder Lebermetastase und könnte durchaus von einer anti-HER2/neu-Antikörpertherapie profitieren.

Zusammenfassend ist die klinische Konsequenz eines akkurat erhobenen HER2/neu-Status für potentiell auf eine anti-HER2/neu-Therapie ansprechende Patienten erheblich. Eine standardisierte HER2/neu-Testung sollte beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom ebenso wie beim Mamma- und Magenkarzinom angestrebt werden.

6. REFERENZEN UND LITERATUR

- 1 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-0070L, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 10.08.2015]
- 2 Wittekind C, Meyer HJ. TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 2010
- 3 Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*, 2004. 22(2): p. 229-37.
- 4 Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther*. 2010 Mar;32(3):437-53. doi: 10.1016/j.clinthera.2010.03.012.
- 5 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
- 6 Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*, 2005. 23(16): p. 3697-705.
- 7 Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Saltz L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26(12): p. 2006-12.
- 8 Pietrantonio F, Cremolini C, Petrelli F, Di Bartolomeo M, Loupakis F, Maggi C, Antoniotti C, de Braud F, Falcone A, Iacovelli R. First-line anti-EGFR monoclonal antibodies in panRAS wild-type metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Jun 5. pii: S1040-8428(15)00114-6. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.016.
- 9 Formica V, Roselli M. Targeted therapy in first line treatment of RAS wild type colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14;21(10):2871-4. doi: 10.3748/wjg.v21.i10.2871.
- 10 Obrand DI, Gordon PH. Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1997 Jan;40(1):15-24.
- 11 Homayounfar K, Bleckmann A, Conradi LC, Sprenger T, Lorf T, Niessner M, Sahlmann CO, Meller J, Liersch T, Ghadimi BM. Metastatic recurrence after complete resection of colorectal liver metastases: impact of surgery and chemotherapy on survival. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Jul;28(7):1009-17. doi: 10.1007/s00384-013-1648-2. Epub 2013 Feb 1.
- 12 Drahle H. Kolorektale Lebermetastasen – Mehr Chemotherapie, mehr Chirurgie? *Chirurg* 2014; 85:4-5 DOI 10.1007/s00104-013-2561-5.
- 13 Wesselmann S, Seufferlein T. Was leisten Darmkrebszentren bei der Diagnostik und Therapie kolorektaler Lebermetastasen? *Chirurg* 2014; 85:6-10 DOI 10.1007/s00104-013-2562-4.

Referenzen und Literatur

- 14 Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
- 15 Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):719-26.
- 16 Yosepovich A, Avivi C, Bar J, Polak-Charcon S, Mardoukh C, Barshack I. Breast cancer HER2 equivocal cases: is there an alternative to FISH testing? A pilot study using two different antibodies sequentially. *Isr Med Assoc J*. 2010 Jun;12(6):353-6.
- 17 Zhou Z, Hick DG. HER2 Amplification or Overexpression in Upper GI Tract and Breast Cancer with Clinical Diagnosis and Treatment. *Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic* 2013 <http://dx.doi.org/10.5772/53921>
- 18 Europäische Arzneimittel-Agentur EMA http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002547/WC500140980.pdf (zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 19 Tolaney S. New HER2-positive targeting agents in clinical practice. *Curr Oncol Rep*. 2014;16(1):359. doi: 10.1007/s11912-013-0359-8.
- 20 Europäische Arzneimittel-Agentur EMA http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000795/WC500044957.pdf (zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 21 Alba E, Albanell J, de la Haba J, Barnadas A, Calvo L, Sánchez-Rovira P, Ramos M, Rojo F, Burgués O, Carrasco E, Caballero R, Porras I, Tibau A, Cámara MC, Lluch A. Trastuzumab or lapatinib with standard chemotherapy for HER2-positive breast cancer: results from the GEICAM/2006-14 trial. *Br J Cancer*. 2014 Mar 4;110(5):1139-47. doi: 10.1038/bjc.2013.831. Epub 2014 Jan 23.
- 22 Europäische Arzneimittel-Agentur EMA http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002280/WC500152392.pdf (zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 23 Europäische Arzneimittel-Agentur EMA http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002389/WC500158593.pdf (zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 24 Krop IE, Lin NU, Blackwell K, Guardino E, Huober J, Lu M, Miles D, Samant M, Welslau M, Diéras V. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis n EMILIA. *Ann Oncol*. 2015 Jan;26(1):113-9. doi: 10.1093/annonc/mdu486. Epub 2014 Oct 29.
- 25 Van den Mooter T, Teuwen LA, Rutten A, Dirix L. Trastuzumab emtansine in advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2015 May;15(5):749-60. doi: 10.1517/14712598.2015.1036026.
- 26 Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):461-71. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70130-X. Epub 2013 Apr 18.

Referenzen und Literatur

- 27 Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, Ellis C, Casey M, Vukelja S, Bischoff J, Baselga J, O'Shaughnessy J. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1124-30. doi: 10.1200/JCO.2008.21.4437. Epub 2010 Feb 1.
- 28 Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, Vogel CL, Goldstein LJ, Somlo G, Gradishar WJ, Hudis CA, Jahanzeb M, Stark A, Wolff AC, Press MF, Winer EP, Paik S, Ljung BM. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006 Jul;4 Suppl 3:S1-22; quiz S23-4.
- 29 Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*. 2012 May;25(5):637-50. doi: 10.1038/modpathol.2011.198. Epub 2012 Jan 6.
- 30 Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.
- 31 Burris HA. Docetaxel (Taxotere) plus trastuzumab (Herceptin) in breast cancer. *Semin Oncol* 2001;28:38-44.
- 32 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde 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.
- 33 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
- 34 Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*. 1989 Apr 15;49(8):2087-90.
- 35 EMEA, European Medicines Agency (2009) Opinion; http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/Herceptin_82246709en.pdf
- 36 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA) : a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376 (9742): 687-697
- 37 Jørgensen JT, Hersom M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. *J Cancer*. 2012;3:137-44. doi: 10.7150/jca.4090. Epub 2012 Mar 12.
- 38 Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol*. 2010;32(1-2):57-65. doi: 10.3233/CLO-2009-0497.
- 39 Rüschoff J, Nagelmeier I, Baretton G, Dietel M, Höfler H, Schildhaus HU, Büttner R, Schlake W, Stoss O, Kreipe HH. Her2-Diagnostik beim Magenkarzinom - Was ist anders im Vergleich zum Mammakarzinom? [Her2 testing in gastric cancer. What is different in comparison to breast cancer?]. *Pathologe*. 2010 May;31(3):208-17. doi: 10.1007/s00292-010-1278-1.

Referenzen und Literatur

- 40 Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984. Epub 2013 Oct 7.
- 41 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. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118-45. Epub 2006 Dec 11.
- 42 Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*. 2010 Sep;457(3):299-307. doi: 10.1007/s00428-010-0952-2. Epub 2010 Jul 28.
- 43 Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Apr 18;93(8):583-96.
- 44 Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-67.
- 45 Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ. HER2 and immunotherapy using monoclonal antibodies in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 2013 Dec;5(12):1267-9. doi: 10.2217/imt.13.131.
- 46 Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer*. 2007 Aug 20;97(4):453-7. Epub 2007 Jul 31.
- 47 Blok EJ, Kuppen PJ, van Leeuwen JE, Sier CF. Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol*. 2013;7:41-51. doi: 10.4137/CMO.S10811. Epub 2013 Feb 21.
- 48 Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984 Dec 6-12;312(5994):513-6.
- 49 Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics*. 1989 Apr;4(3):362-6.
- 50 Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986 Jun 27;232(4758):1644-6.
- 51 Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007; 26(45):6469-87.
- 52 Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
- 53 Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer*. 2007 Aug 20;97(4):453-7. Epub 2007 Jul 31.
- 54 LoRusso P, Jänne PA, Oliveira M, Rizvi N, Malburg L, Keedy V, Yee L, Copigneaux C, Hettmann T, Wu CY, Ang A, Halim AB, Beckman RA, Beaupre D, Berlin J. Phase I study of U3-1287, a fully human anti-HER3 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2013 Jun 1;19(11):3078-87. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3051. Epub 2013 Apr 16.

Referenzen und Literatur

- 55 Styczen H, Nagelmeier I, Beissbarth T, Nietert M, Homayounfar K, Sprenger T, Boczek U, Stanek K, Kitz J, Wolff HA, Ghadimi BM, Middel P, Liersch T, Rüschoff J, Conradi LC. HER-2 and HER-3 expression in liver metastases of patients with colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):15065-76.
- 56 Emde A, Kostler WJ, Yarden Y. Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010.
- 57 Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN. Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1713-9.
- 58 Ramanathan RK, Hwang JJ, Zamboni WC, Sinicrope FA, Safran H, Wong MK, Earle M, Brufsky A, Evans T, Troetschel M, Walko C, Day R, Chen HX, Finkelstein S. Low overexpression of HER-2/neu in advanced colorectal cancer limits the usefulness of trastuzumab (Herceptin) and irinotecan as therapy. A phase II trial. *Cancer Invest*. 2004;22(6):858-65.
- 59 Kapitanović S, Radosević S, Kapitanović M, Andelinović S, Ferencić Z, Tavassoli M, Primorać D, Sonicki Z, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R. The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1997 Apr;112(4):1103-13.
- 60 Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SH, Sternberg SS, Enker WE. Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer. *Cancer*. 1984 Mar 15;53(6):1354-62.
- 61 Park DI, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Han WK, Kim H, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007 May;22(5):491-7. Epub 2006 Sep 1.
- 62 André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2343-51.
- 63 Kavanagh DO, Chambers G, O'Grady L, Barry KM, Waldron RP, Bennani F, Eustace PW, Tobbia I. Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer? *BMC Cancer*. 2009 Jan 1;9:1. doi: 10.1186/1471-2407-9-1.
- 64 Nathanson DR, Culliford AT 4th, Shia J, Chen B, D'Alessio M, Zeng ZS, Nash GM, Gerald W, Barany F, Paty PB. HER 2/neu expression and gene amplification in colon cancer. *Int J Cancer*. 2003 Jul 20;105(6):796-802.
- 65 Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol*. 2004 Aug;17(8):895-904.
- 66 Marx AH, Burandt EC, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Atanackovic D, Bokemeyer C, Fiedler W, Terracciano L, Sauter G, Izbicki JR. Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol*. 2010 Nov;41(11):1577-85. doi: 10.1016/j.humpath.2010.02.018. Epub 2010 Jul 24.
- 67 Kruszewski WJ, Rzepko R, Ciesielski M, Szefel J, Zieliński J, Szajewski M, Jasiński W, Kawecki K, Wojtacki J. Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. *Dis Markers*. 2010;29(5):207-12. doi: 10.3233/DMA-2010-0742.

Referenzen und Literatur

- 68 Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinicrope FA. HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer*. 2004 Feb 10;108(4):540-8.
- 69 Seo AN, Kwak Y, Kim DW, Kang SB, Choe G, Kim WH, Lee HS. HER2 status in colorectal cancer: its clinical significance and the relationship between HER2 gene amplification and expression. *PLoS One*. 2014 May 30;9(5):e98528. doi: 10.1371/journal.pone.0098528. eCollection 2014.
- 70 Leung SP, Griffith OL, Masoudi H, Gown A, Jones S, Phang T, Wiseman SM. Clinical utility of type 1 growth factor receptor expression in colon cancer. *Am J Surg*. 2008 May;195(5):604-10.
- 71 Richman SD, Southward K, Chambers P, Cross D, Barrett J, Hemmings G, Taylor M, Wood H, Hutchins G, Foster JM, Oumie A, Spink KG, Brown SR, Jones M, Kerr D, Handley K, Gray R, Seymour M, Quirke P. HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *J Pathol*. 2016 Mar;238(4):562-70. doi: 10.1002/path.4679. Epub 2016 Jan 29.
- 72 Corbett IP, Henry JA, Angus B, Watchorn CJ, Wilkinson L, Hennessy C, Gullick WJ, Tuzi NL, May FE, Westley BR. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 1990 May;161(1):15-25.
- 73 Stancovski I, Hurwitz E, Leitner O, Ullrich A, Yarden Y, Sela M. Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the ERBB2 receptor on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1;88(19):8691-5.
- 74 Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986 Jun 27;232(4758):1644-6.
- 75 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. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8197. Epub 2009 Feb 9.
- 76 Wilson MS, Anderson E, Bell JC, Pearson JM, Haboubi NY, James RD, Schofield PF. An evaluation of five different methods for estimating proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Surg Oncol*. 1994 Oct;3(5):263-73.
- 77 Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981, 75(6):816-21
- 78 Lipkin M. Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects. *Cancer Res*. 1988 Jan 15;48(2):235-45.
- 79 Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008 Jun;52(7):797-805. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03028.x. Epub 2008 Apr 18.
- 80 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986, 1(8476):307-10
- 81 Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996 Jul 4;13(1):63-72.
- 82 Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, Dupuis B, Parker RL. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2001 Nov;14(11):1079-86.

Referenzen und Literatur

- 83 Cho EY, Srivastava A, Park K, Kim J, Lee MH, Do I, Lee J, Kim KM, Sohn TS, Kang WK, Kim S. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. *Pathology*. 2012 Apr;44(3):216-20. doi: 10.1097/PAT.0b013e3283513e8b.
- 84 Valtorta E, Martino C, Sartore-Bianchi A, Penault-Llorca F, Viale G, Risio M, Ruggie M, Grigioni W, Bencardino K, Lonardi S, Zagonel V, Leone F, Noe J, Ciardiello F, Pinto C, Labianca R, Mosconi S, Graiff C, Aprile G, Frau B, Garufi C, Loupakis F, Racca P, Tonini G, Lauricella C, Veronese S, Truini M, Siena S, Marsoni S, Gambacorta M. Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: results from a validation study. *Mod Pathol*. 2015 Nov;28(11):1481-91. doi: 10.1038/modpathol.2015.98. Epub 2015 Oct 9.
- 85 Tumorzentrum München, *Manual Mammakarzinome*, 15. Auflage, 2015, W. Zuckschwerdt Verlag München
- 86 Vucicevic D, Carey EJ, Karlin NJ. Trastuzumab-induced hepatotoxicity: a case report. *Breast Care (Basel)*. 2013 May;8(2):146-8. doi: 10.1159/000346844.
- 87 Europäische Arzneimittel-Agentur EMA
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf (zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 88 Pavlakis K, Kountourakis P, Stathopoulos E, Psyrris A, Rontogianni D, Kafousi M, Derivianaki M, Xiros N, Pectasides D, Economopoulos T. Her-2 protein expression, cellular localization, and gene amplification in colorectal carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Dec;15(4):441-5.
- 89 Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, Pectasides D, Economopoulos T. Clinicopathologic significance of EGFR and Her-2/neu in colorectal adenocarcinomas. *Cancer J*. 2006 May-Jun;12(3):229-36.
- 90 Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, Kim BS, Jang SJ, Kang YK. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? *Hum Pathol*. 2012 Mar;43(3):413-22. doi: 10.1016/j.humpath.2011.05.019. Epub 2011 Aug 19.
- 91 Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*. 1994 May 15;54(10):2771-7.
- 92 Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Pathology Research International*, Vol. 2011, Article ID 903202, 16 pages, 2011. doi:10.4061/2011/903202
- 93 Powell WC, Hicks DG, Prescott N, Tarr SM, Laniauskas S, Williams T, Short S, Pettay J, Nagle RB, Dabbs DJ, Scott KM, Brown RW, Grogan T, Roche PC, Tubbs RR. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Mar;15(1):94-102.
- 94 <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm301469.html> (zuletzt aufrufen 01.05.2016)
- 95 Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski Ch, Wrba F. HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2006 May 8;6:123.
- 96 Penault-Llorca F, Adelaïde J, Houvenaeghel G, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J. Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation. *J Pathol*. 1994 May;173(1):65-75.

Referenzen und Literatur

- 97 Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Rüschoff J, van de Vijver M. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol*. 2009 Oct;132(4):539-48. doi: 10.1309/AJCPV2IOHGPMGBSQ.
- 98 Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*. 2001 Sep;25(9):1204-7.
- 99 Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol*. 2007 Feb;20(2):192-8.
- 100 Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol*. 1999 Apr;9(2):125-38.
- 101 Mirlacher M, Kasper M, Storz M, Knecht Y, Dürmüller U, Simon R, Mihatsch MJ, Sauter G. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2004 Nov;17(11):1414-20.
- 102 Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.
- 103 Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Andrac L. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*. 1997;75(11):1667-73.
- 104 Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1;18(21):3651-64.
- 105 van Diest PJ, Baak JP, Chin D, Theeuwes JW, Bacus SS. Quantitation of HER-2/neu oncoprotein overexpression in invasive breast cancer by image analysis: a study comparing fresh and paraffin-embedded material. *Anal Cell Pathol*. 1991 Jul;3(4):195-202.
- 106 Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E, Troiani T, Ciardiello F, Racca P, Bertotti A, Siravegna G, Torri V, Amatu A, Ghezzi S, Marrapese G, Palmeri L, Valtorta E, Cassingena A, Lauricella C, Vanzulli A, Regge D, Veronese S, Comoglio PM, Bardelli A, Marsoni S, Siena S. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):738-46. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00150-9. Epub 2016 Apr 20.
- 107 Dekker TJ, ter Borg S, Hooijer GK, Meijer SL, Wesseling J, Boers JE, Schuurin E, Bart J, van Gorp J, Bult P, Riemersma SA, van Deurzen CH, Sleddens HF, Mesker WE, Kroep JR, Smit VT, van de Vijver MJ. Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jul;152(2):247-52. doi: 10.1007/s10549-015-3444-x. Epub 2015 Jun 4.
- 108 Essapen S, Thomas H, Green M, De Vries C, Cook MG, Marks C, Topham C, Modjtahedi H. The expression and prognostic significance of HER-2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. *Int J Oncol*. 2004 Feb;24(2):241-8.
- 109 Osako T, Miyahara M, Uchino S, Inomata M, Kitano S, Kobayashi M. Immunohistochemical study of c-erbB-2 protein in colorectal cancer and the correlation with patient survival. *Oncology*. 1998 Nov-Dec;55(6):548-55.

Referenzen und Literatur

- 110 Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, Tubbs RR, Skacel M, Grogan T, Roche P, Hicks DG. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep;29(9):1221-7.
- 111 Gouvêa AP, Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):103-8.
- 112 Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol*. 2003 Apr;199(4):418-23.
- 113 Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn*. 2003 Aug;5(3):155-9.
- 114 Liu YH, Xu FP, Rao JY, Zhuang HG, Luo XL, Li L, Luo DL, Zhang F, Xu J. Justification of the change from 10% to 30% for the immunohistochemical HER2 Scoring criterion in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2009 Jul;132(1):74-9. doi: 10.1309/AJCPG3LCVKPNFJ6R.
- 115 Starczynski J, Atkey N, Connelly Y, O'Grady T, Campbell FM, di Palma S, Wencyk P, Jasani B, Gandy M, Bartlett JM; UKNEQAS. HER2 gene amplification in breast cancer: a rogues' gallery of challenging diagnostic cases: UKNEQAS interpretation guidelines and research recommendations. *Am J Clin Pathol*. 2012 Apr;137(4):595-605. doi: 10.1309/AJCPATBZ2JFN1QQC.
- 116 Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):1972-7.
- 117 Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, King CR. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J*. 1987 Mar;6(3):605-10.
- 118 Kameda T, Yasui W, Yoshida K, Tsujino T, Nakayama H, Ito M, Ito H, Tahara E. Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res*. 1990 Dec 15;50(24):8002-9.
- 119 Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol*. 2004 Jan;121(1):70-7.
- 120 Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaf PL, Wiley JC, Kussick SJ, Gown AM. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 1;29(31):4168-74. doi: 10.1200/JCO.2011.36.0107. Epub 2011 Sep 26.
- 121 Dittmar Y, Settmacher U. Individualized treatment of gastric cancer: Impact of molecular biology and pathohistological features. *World J Gastrointest Oncol*. 2015 Nov 15;7(11):292-302. doi: 10.4251/wjgo.v7.i11.292.
- 122 Prins MJ, Ruurda JP, van Diest PJ, van Hillegersberg R, Ten Kate FJ. The significance of the HER-2 status in esophageal adenocarcinoma for survival: an immunohistochemical and an in situ hybridization study. *Ann Oncol*. 2013 May;24(5):1290-7. doi: 10.1093/annonc/mds640. Epub 2013 Jan 18.
- 123 Yoon HH, Shi Q, Sukov WR. HER2 testing in esophageal adenocarcinoma using parallel tissue-based methods. 2013 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract 2. Presented January 24, 2013

Referenzen und Literatur

- 124 Yoon H. IHC Preferred Over FISH for Initial HER2 Screening in Esophageal Cancer. *GI Cancers Symposium 2013*
- 125 Antonacopoulou AG, Tsamandas AC, Petsas T, Liava A, Scopa CD, Papavassiliou AG, Kalofonos HP. EGFR, HER-2 and COX-2 levels in colorectal cancer. *Histopathology*. 2008 Dec;53(6):698-706.
- 126 D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole K, Wolf B, Steele G Jr, Summerhayes IC. Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene*. 1989 Oct;4(10):1233-9.
- 127 Sträter J, Koretz K, Günthert AR, Möller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut*. 1995 Dec;37(6):819-25.
- 128 Porebska I, Harlozińska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol*. 2000 Mar-Apr;21(2):105-15.
- 129 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- 130 Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Anastassopoulos P, Nakopoulou L, Panoussopoulos D, Papadimitriou K. Prognostic significance of p53 and c-erbB-2 immunohistochemical evaluation in colorectal adenocarcinoma. *Histol Histopathol*. 1995 Jul;10(3):661-8.
- 131 Ingold Heppner B, Behrens HM, Balschun K, Haag J, Krüger S, Becker T, Röcken C. HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Nov 11;111(10):1977-84. doi: 10.1038/bjc.2014.483. Epub 2014 Sep 11.
- 132 Lee WS, Park YH, Lee JN, Baek JH, Lee TH, Ha SY. Comparison of HER2 expression between primary colorectal cancer and their corresponding metastases. *Cancer Med*. 2014 Jun;3(3):674-80. doi: 10.1002/cam4.228. Epub 2014 Mar 25.
- 133 Almhanna K, Meredith KL, Hoffe SE, Shridhar R, Coppola D. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 in esophageal cancer. *Cancer Control*. 2013 Apr;20(2):111-6.
- 134 Yoon HH, Shi Q, Sukov WR, Wiktor AE, Khan M, Sattler CA, Grothey A, Wu TT, Diasio RB, Jenkins RB, Sinicrope FA. Association of HER2/ErbB2 expression and gene amplification with pathologic features and prognosis in esophageal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012 Jan 15;18(2):546-54. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2272.
- 135 Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS. HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Human pathology* 2000; 31(1):35-9
- 136 Reichert U, Duesedau P, Tsourlakis M. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* 2007; 20(1):120-9.
- 137 Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol*. 2011 Jan;18(1):53-9. doi: 10.1097/PAP.0b013e3182026d72.
- 138 Chan OT, Chen ZM, Chung F, Kawachi K, Phan DC, Himmelfarb E, Lin F, Perry A, Wang HL. Lack of HER2 overexpression and amplification in small intestinal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 Dec;134(6):880-5.
- 139 Conradi LC, Styczen H, Sprenger T, Wolff HA, Rödel C, Nietert M, Homayounfar K, Gaedcke J, Kitz J, Talaulicar R, Becker H, Ghadimi M, Middel P, Beissbarth T, Rüschoff J, Liersch T. Frequency of HER-2 positivity in rectal cancer and prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Apr;37(4):522-31.

Referenzen und Literatur

- 140 Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C, Ribero D, Russolillo N, Muratore A, Massucco P, Pisacane A, Molinaro L, Valtorta E, Sartore-Bianchi A, Risio M, Capussotti L, Gambacorta M, Siena S, Medico E, Sapino A, Marsoni S, Comoglio PM, Bardelli A, Trusolino L. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2011 Nov;1(6):508-23. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0109. Epub 2011 Sep 2.
- 141 Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol.* 2009 Jun;40(6):769-77. doi: 10.1016/j.humpath.2008.11.014. Epub 2009 Mar 9.
- 142 Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, Quaas A, Link BC, Schurr PG, Kaifi JT, Gros SJ, Yekebas EF, Marx A, Simon R, Izbicki JR, Sauter G. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol.* 2007 Jan;20(1):120-9. Epub 2006 Nov 24.
- 143 Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L. HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2007 Jul;60(7):768-72. Epub 2006 Aug 1.
- 144 Stahl PR, Schnellert J, Koop C, Simon R, Marx A, Izbicki JR, Sauter G, Quaas A. Determination of Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancers Using Heterogeneity Tissue Microarrays. *Pathol Oncol Res.* 2015 Sep;21(4):1183-9. doi: 10.1007/s12253-015-9953-4. Epub 2015 May 31.
- 145 Sorscher SM. Marked response to single agent trastuzumab in a patient with metastatic HER-2 gene amplified rectal cancer. *Cancer Invest.* 2011 Aug;29(7):456-9. doi: 10.3109/07357907.2011.590569. Epub 2011 Jun 22.
- 146 Disel U, Germain A, Yilmazel B, Abali H, Bolat FA, Yelensky R, Elvin JA, Lipson D, Chmielecki J, Wang K, Stephens PJ, Ross JS, Miller VA, Ali SM, George TJ Jr. Durable clinical benefit to trastuzumab and chemotherapy in a patient with metastatic colon adenocarcinoma harboring ERBB2 amplification. *Oncoscience.* 2015 Jul 1;2(6):581-4. eCollection 2015.
- 147 Kuwada SK, Scaife CL, Kuang J, Li X, Wong RF, Florell SR, Coffey RJ Jr, Gray PD. Effects of trastuzumab on epidermal growth factor receptor-dependent and -independent human colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2004 Mar 20;109(2):291-301.
- 148 Giannopoulou E, Antonacopoulou A, Floratou K, Papavassiliou AG, Kalofonos HP. Dual targeting of EGFR and HER-2 in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 May;63(6):973-81. doi: 10.1007/s00280-008-0820-9. Epub 2008 Aug 27.
- 149 LaBonte MJ, Manegold PC, Wilson PM, Fazzino W, Louie SG, Lenz HJ, Ladner RD. The dual EGFR/HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib sensitizes colon and gastric cancer cells to the irinotecan active metabolite SN-38. *Int J Cancer.* 2009 Dec 15;125(12):2957-69. doi: 10.1002/ijc.24658.
- 150 Frank D, Jumonville A, Loconte NK, Schelman WR, Mulkerin D, Lubner S, Richter K, Winterle N, Wims MB, Dietrich L, Winkler JM, Volk M, Kim K, Holen KD. A phase II study of capecitabine and lapatinib in advanced refractory colorectal adenocarcinoma: A Wisconsin Oncology Network study. *J Gastrointest Oncol.* 2012 Jun;3(2):90-6. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.049.
- 151 Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol.* 2010 Mar 1;28(7):1138-44. doi: 10.1200/JCO.2009.24.2024. Epub 2010 Feb 1.

Referenzen und Literatur

- 152 EU Clinical Trials Register
<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2012-002128-33/IT>
(zuletzt aufgerufen 03.07.2016)
- 153 Wei Q, Shui Y, Zheng S, Wester K, Nordgren H, Nygren P, Glimelius B, Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in primary colorectal carcinomas and corresponding metastases: Implications for targeted radionuclide therapy. *Oncol Rep.* 2011 Jan;25(1):3-11.
- 154 Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, Ostenstad B, Lundqvist H, Blomqvist C. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer.* 2004 Jun 14;90(12):2344-8.
- 155 Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, Crafa P, Bassano C, Tamagnini I, Gardini G, Nizzoli R, Leonardi F, Gasparro D, Camisa R, Cavalli S, Silini EM, Ardizzoni A. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Br J Cancer.* 2011 Apr 26;104(9):1372-6. doi: 10.1038/bjc.2011.121. Epub 2011 Apr 12.
- 156 Benjamin MA, Riker AI. A Case of Male Breast Cancer with a BRCA Gene Mutation. *Ochsner J.* 2015 Winter;15(4):448-51.
- 157 von Einem JC, Heinemann V, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, Decker T, Klein S, Held S, Jung A, Kirchner T, Haas M, Holch J, Michl M, Aubele P, Boeck S, Schulz C, Giessen C, Stintzing S, Modest DP. Left-sided primary tumors are associated with favorable prognosis in patients with KRAS codon 12/13 wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus chemotherapy: an analysis of the AIO KRK-0104 trial. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Sep;140(9):1607-14. doi: 10.1007/s00432-014-1678-3. Epub 2014 May 10.
- 158 Klufftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol.* 1992 Feb;1(1):97-105.
- 159 Ochs AM, Wong L, Kakani V, Neerukonda S, Gorske J, Rao A, Riggs M, Ward H, Keville L. Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival. *Clin Colorectal Cancer.* 2004 Nov;4(4):262-7.
- 160 Pyo JS, Kang G, Park K. Clinicopathological significance and diagnostic accuracy of HER2 immunohistochemistry in colorectal cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2016 Apr 18:0. doi: 10.5301/ijbm.5000208.
- 161 Hoff ER, Tubbs RR, Myles JL, Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. *Am J Clin Pathol.* 2002 Jun;117(6):916-21.
- 162 Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. *Breast J.* 2005 Jul-Aug;11(4):278-80.
- 163 Shokouh TZ, Ezatollah A, Barand P. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study. *Medicine (Baltimore).* 2015 Aug;94(32):e1359. doi: 10.1097/MD.0000000000001359.
- 164 Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg.* 2009 Oct;33(10):2112-8. doi: 10.1007/s00268-009-0142-z.
- 165 Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 2008 Sep;19(9):1523-9. doi: 10.1093/annonc/mdn169. Epub 2008 Apr 25.

Referenzen und Literatur

- 166 He C, Bian XY, Ni XZ, Shen DP, Shen YY, Liu H, Shen ZY, Liu Q. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(14):2171-8. doi: 10.3748/wjg.v19.i14.2171.
- 167 Richards CH, Roxburgh CS, Powell AG, Foulis AK, Horgan PG, McMillan DC. The clinical utility of the local inflammatory response in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2014 Jan;50(2):309-19. doi: 10.1016/j.ejca.2013.09.008. Epub 2013 Oct 5.
- 168 Saeki T, Salomon DS, Johnson GR, Gullick WJ, Mandai K, Yamagami K, Moriwaki S, Tanada M, Takashima S, Tahara E. Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 1995 Dec;25(6):240-9.

7. DANKSAGUNG

Frau PD Dr. Barbara Mayer danke ich für das Überlassen des hochaktuellen, interessanten und vielseitigen Forschungsthemas, für die Betreuung und Hilfeleistungen während meiner Promotion.

Ein besonderer Dank gilt meiner Kollegin und Doktorandin Frau Melanie Zoller (ebenfalls aus meiner Arbeitsgruppe um PD Dr. B. Mayer) für den produktiven Austausch an Daten, Informationen und Erfahrungen sowie die Nachuntersuchung meiner Präparate zu Validierungszwecken.

Ein weiterer Dank spreche ich meinem Doktorandenkollegen Dr. med. Andreas Bogner für die Hilfeleistung und Zusammenarbeit bezüglich der Zusammenstellung der klinisch-pathologischen Daten unseres gemeinsamen Kollektiv aus.

Frau Dr. med. Mareile Joka danke ich für die fachliche und persönliche Unterstützung und Hilfestellung im klinischen Teil der Dissertation.

Einen herzlichen Dank an jeden Einzelnen auch ehemalige Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe (AG Metastasierung) für die stetige Hilfsbereitschaft und ausgesprochene Kollegialität.

Für die Kooperation und Überlassen der Daten der Paraffinhistologie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung danke ich Dr. Hessel und Dr. Neumann des pathologischen Instituts der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. T. Kirchner.

Danken möchte ich nicht zuletzt meiner Familie, insbesondere meiner Frau Katrin Singer und meinem Sohn für ihre ausgesprochene Unterstützung, ihr Verständnis und ihrer ausdauernden Geduld während der gesamten Zeit der Promotion.

Ausgesprochener Dank an Prof. Dr. Josef Rüschoff, Pathologie Nordhessen in Kassel, für die Erklärung und das Training der speziellen Auswertung von HER2/neu-Färbepreparaten.

Vielen Dank an Dr. med. Alexander Crispin aus dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Universität München für die Beratung bezüglich der statistischen Auswertung.

8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in abteilungsinternen Doktorandenkolloquien sowie auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt.

- Kongressbeiträge**
- Chirurgische Forschungstage, München, 2009 (Poster)
 - Deutscher Krebskongress, Berlin, 2010 (Poster)
 - Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 2010 (Präsentation)
 - World Congress On Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2011 (Poster)
- Zitierfähige Beiträge**
- Ludwig C, Paulick S, Kloß D, Joka M, **Singer T**, Funke I, Jauch K-W, Mayer B
Selektion effizienter, nebenwirkungsarmer Medikamente für die Therapie gastrointestinaler Karzinome mit dem multizellulären Sphäroidmodell
Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2009, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Volume 38, V, 65-66, 2009 (Buchbeitrag)
- Singer T**, Jauch K-W, Mayer B
Identification and clinical value of predictive biomarkers in primary and metastatic colorectal cancers
Langenbeck's Archives of Surgery, 394: 27, 924, 2009 (Abstract)
- Mayer B, **Singer T**, Bogner A, Jauch K-W
Prädiktive Biomarker für chemotherapeutische und molekulare Therapiestrategien beim primären kolorektalen Karzinom und resektablen Lebermetastasen
Onkologie, 33 (suppl 2): PO152, 144, 2010 (Abstract)
- Mayer B, Bogner A, Jauch K-W, **Singer T**
KRAS/BRAF Mutationsstatus als prädiktiver Biomarker für die Anti-EGFR Antikörpertherapie beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom
Onkologie, 33 (suppl 2): FV336, 151, 2010 (Abstract)
- Singer T**, Bogner A, Jauch K-W, Mayer B
Prädiktive Biomarker für chemotherapeutische und molekulare Therapiestrategien beim primären kolorektalen Karzinom und resektablen Lebermetastasen
Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Volume 39, VI, 85-86, 2010 (Buchbeitrag)
- Singer T**, Bogner A, Zoller M, Joka M, Jauch K-W, Mayer B
HER2 expression in colorectal tumours is more similar to gastric compared to breast cancer
Annals of Oncology, 22 (suppl 5): P-0346, v116, 2011 (Abstract)
- Bogner A, **Singer T**, Jung A, Joka M, Jauch K-W, Mayer B
Multiplexed genetic biomarker profiling in colorectal cancer
Annals of Oncology, 22 (suppl 5): P-0348, v116, 2011 (Abstract)
- Zoller M, **Singer T**, Joka M, Jauch K-W, Mayer B
Trastuzumab treatment in HER2/neu overexpressing metastatic colorectal cancer
Langenbeck's Archives of Surgery, 398: 41, 637, 2013 (Abstract)

9. ERKLÄRUNG

Zur Erhöhung der Fallzahl und Erreichen einer besseren statistischen Signifikanz erfolgte ein Pooling mit Daten von Frau Melanie Zoller (Doktorandin der Arbeitsgruppe Metastasierung der Forschung Chirurgie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern unter der Leitung von PD Dr. Barbara Mayer): somit wurden immunhistologische Daten von 39 Primärtumoren und 20 kolorektalen Lebermetastasen dem Kollektiv hinzugefügt.

Zum Vergleich der erhobenen HER2/neu-Ergebnisse mittels Kryoimmunhistochemie dienten Daten aus Paraffinimmunhistochemie sowie Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung des pathologischen Instituts Innenstadt der Universität München, erhoben von Dr. Hermann Hessel unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kirchner.

Die Erhebung der klinisch-pathologischen Patientendaten sowie Erstellung der Datenbank erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Andreas Bogner (ehemals Doktorand der Arbeitsgruppe Metastasierung der Forschung Chirurgie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern unter der Leitung von PD Dr. Barbara Mayer).

Die Zellkultur zur Herstellung der Zytospinpräparate wurde durch laboreigene technische Mitarbeitern durchgeführt.

Eidesstattliche Versicherung

Singer Thomas Christian

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tumorbiologische Wertigkeit von HER2/neu beim primären und hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.08.2016