

**Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. Th. Kirchner**

**HER-2/*neu*
Genamplifikation und Rezeptorüberexpression
in verschiedenen Tumoren des Ovars**

Tissue Microarray - Untersuchung
mit Hilfe von
Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie

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

**vorgelegt von
Veronika Kanitz
aus
München**

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Diebold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. L. Sommer

Priv. Doz. Dr. C. Buske

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Epitheliale Ovarialtumoren: Definition, Epidemiologie, Diagnostik und Pathologie	S. 1
1.2 Maligne Müller'sche Mischtumoren	S. 7
1.3 Granulosazelltumoren	S. 8
1.4 Her-2/ <i>neu</i> : Molekulare Grundlagen und Bedeutung	S. 8
1.5 Her-2/ <i>neu</i> : Nachweismethoden von Rezeptor und Gen	S. 12
1.6 Her-2/ <i>neu</i> beim Mammakarzinom	S. 13
1.7 Tissue Microarray	S. 16

<u>2. Fragestellung</u>	S. 18
-------------------------------	-------

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv	S. 19
3.2 Auswahl der Präparate für die Materialentnahme	S. 20
3.3 Anfertigung der Tissue Microarray Blöcke	S. 21
3.4 Schneiden und Färben.....	S. 24
3.4.1 HE-Färbung	
3.4.2 Immunhistochemischer HercepTest®	
3.4.3 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	
3.5 Auswertung und Auswertungskriterien	S. 26
3.5.1 Auswertung der HE-Färbung	
3.5.2 Auswertung der Immunhistologie	
3.5.3 Auswertung der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	
3.5.4 Statistische Auswertung	

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung des Tissue Microarrays in Bezug auf seine Qualität	S. 29
4.1.1 Anfertigte Schnitte und Schnittdicken	
4.1.2 Qualität der Methode	
4.1.3 Tumorgehalt der einzelnen Stenzen und Verlust von Stenzenmaterial	
4.1.4 Auswertbarkeit der verschiedenen Untersuchungen	
4.2 Analyse des Studienkollektivs bezüglich konventioneller klinischer und pathologischer Parameter	S. 32
4.2.1 Ovarialkarzinome	
4.2.2 Borderline-Tumoren	
4.2.3 Granulosazelltumoren	
4.2.4 Maligne Müller'sche Mischtumoren	
4.2.5 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitale	

4.3 Immunhistochemische Untersuchung des Her-2/<i>neu</i> Rezeptors mit dem HercepTest®	S. 39
4.3.1 Ovarialkarzinome	
4.3.2 Borderline-Tumoren	
4.3.3 Granulosazelltumoren	
4.3.4 Benigne Zystadenome	
4.3.5 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitale	
4.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Her-2/<i>neu</i> Gens	S. 45
4.4.1 Allgemeine Auswertbarkeit	
4.4.2 Ovarialkarzinome	
4.4.3 Borderline-Tumoren	
4.4.4 Karzinome und Borderline-Tumoren	
4.4.5 Granulosazelltumoren	
4.4.6 Benigne Zystadenome	
4.4.7 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitales	
4.4.8 Maligne Müller`sche Mischtumoren	
4.5 Gegenüberstellung von Immunhistochemie und FISH	S. 54
 <u>5. Diskussion</u>	
5.1 Bedeutung von Her-2/<i>neu</i> Gen- und Rezeptorveränderungen in.....	S. 56
5.1.1 Ovarialkarzinomen	
5.1.2 Borderline-Tumoren	
5.1.3 Malignen Müller`schen Mischtumoren	
5.1.4 Granulosazelltumoren	
5.2 Tissue Microarray	S. 69
5.3 Wertigkeit der Immunhistochemie (HercepTest®) im Vergleich zur Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung	S. 72
6. Zusammenfassung	S. 81
7. Literaturverzeichnis	S. 82
8. Verzeichnis der Abkürzungen	S. 95
9. Danksagung	S. 96
10. Lebenslauf	S. 97
11. Anhang	S. 98

1. Einleitung

1.1 Epitheliale Ovarialtumoren:

Definition, Epidemiologie, Diagnostik und Pathologie

Die Gruppe der malignen Tumoren des Ovars ist überaus heterogen. Man unterscheidet aufgrund des Ursprungsgewebes zwischen epithelialen Tumoren, Keimstrang-Stroma-Tumoren und Keimzelltumoren sowie weiteren seltenen Tumorarten. In ihrem klinischen Verhalten variieren sie sehr.

Für das Jahr 2000 wurden über 9600 Neuerkrankungen an malignen Ovarialtumoren in Deutschland ermittelt, was einem Anteil von 5% an allen Krebsneuerkrankungen entspricht. Rund 90 % dieser Tumoren sind Karzinome, d.h. epithelialen Ursprungs. Trotz der relativ niedrigen Inzidenz sind Ovarialkarzinome mit etwa 6000 Sterbefällen im Jahr 2000 in Deutschland die zweithäufigste Todesursache in der Gruppe der malignen gynäkologischen Tumorerkrankungen noch vor dem weitaus häufigeren Zervixkarzinom. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt über alle Tumorstadien gemittelt bei etwa 40%. Aufgrund des Mangels an charakteristischen Symptomen werden 70% der meist älteren Patientinnen erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Engel et al., 2004). Für diese Patientinnen ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit 21 % im FIGO-Stadium III bzw. 6 % im FIGO-Stadium IV gegenüber 76 % im FIGO-Stadium I bzw. 42 % im FIGO II deutlich reduziert (Brun et al., 2000).

Zu den etablierten prognostisch relevanten Faktoren zählen vor allem klinische Parameter, wie zum Beispiel das Tumorstadium (nach FIGO, siehe unten) bei Diagnosestellung. Die Stadieneinteilung folgt dem FIGO-System (**F**édération **I**nternationale de **G**ynécologie et d'**O**bstétrique), bzw. dem TNM-System der UICC (**U**nion **I**nternational **C**ontre **C**ancer), die sich weitgehend entsprechen. Wichtiger zusätzlicher Faktor ist die Radikalität der Operation, die sich in der postoperativ verbleibenden Resttumormasse ausdrückt. Dabei ist die Resttumormasse in hohem Maße abhängig von dem zugrunde liegenden Tumorstadium.

Stadieneinteilung:

TNM	FIGO	Befundsituation
Tx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/ oder N1,2	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung \leq 2cm
T3c	und/ oder N1,2 IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausgeschl. Peritonealmetastasen)
NX		- regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		- keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		- regionäre Lymphknotenmetastasen

Weitere prognostische Einflussfaktoren sind das Alter der Patientin bei Diagnosestellung und die Durchführung einer Chemotherapie.

Von den pathologischen Parametern ist das Tumorgrading in seiner Wertigkeit als Prognosefaktor umstritten.

In das histopathologische Gradingssystem nach Silverberg fließen die Beurteilung der Kernpleomorphie, der Tumorarchitektur und der Mitosefrequenz mit unterschiedlichen Punktwerten ein. Aus der Summe der zugeteilten Punkte ergibt sich der Differenzierungsgrad. Geringe Differenzierung korreliert mit einer ungünstigeren Prognose (Silverberg, 2000). Das Silverberg-System ermöglicht eine einheitliche Graduierung der verschiedenen malignen epithelialen Tumoren des Ovars. Seine Aussagekraft wurde in unabhängigen Studien bestätigt (Mayr et al., 2000).

Die Ätiologie der Ovarialkarzinome ist nicht aufgeklärt. Ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren wird diskutiert. Eine steigende Zahl an ovulatorischen Zyklen, Nulliparität und fortgeschrittenes Lebensalter zählen zu den Hauptrisikofaktoren der sporadisch auftretenden Karzinome. Schwangerschaften und medikamentöse Ovulationshemmung hingegen gelten als protektive Faktoren mit einer Risikoreduktion um 40-50% (Berchuk et al., 1997). Die Rolle der Ovulation wird am Beispiel des Turner Syndroms deutlich. Frauen mit diesem Syndrom haben ausschließlich anovulatorische Zyklen. Ovarialkarzinome sind in dieser Patientengruppe eine Rarität.

Die Ovulation führt demnach zu mindestens drei verschiedenen Veränderungen. Jeder Zyklus geht mit einer hohen hormonellen Stimulation einher. Das Müller'sche Deckepithel wird durch den Eisprung geschädigt und muss sich regenerieren, was die Wahrscheinlichkeit von Spontanmutationen erhöht. Ob es im Rahmen der Ovulation zum Einschluss des Müller'schen Deckepithels kommt und daraus Inklusionszysten entstehen, oder ob diese Zysten durch ein dynamisches Zusammenspiel von Ovarialdeckepithel und darunterliegendem Ovarialstroma entstehen ist nicht gänzlich geklärt (Scully et al., 1995). Epithelproliferationen innerhalb dieser Inklusionszysten könnten dann zur intraovariellen Tumorentwicklung führen.

Umstritten ist dabei die Stellung der Borderline-Tumoren. Als Borderline-Tumoren bezeichnet man dabei atypische Epithelproliferate bei intakter Basalmembran und somit ohne Invasion des ovariellen Stomas. Diese Veränderungen zeichnen sich aufgrund ihres niedrig malignen Potentials (**L**ow **M**alignant **P**otential = LMP) durch eine exzellente Prognose aus (5-Jahres-Überlebensrate > 90 %). Ob sie eine eigene

Tumorentität oder eine Übergangsform auf dem Weg zum invasiven Tumor darstellen, ob sie eine Vorstufe zu hoch differenzierten Tumoren sind oder das Potential zur Transformation in hochaggressive Neoplasien mit geringer Differenzierung besitzen, ist Gegenstand zahlreicher Studien (u.a. Berchuk et al., 1997; Shih et al., 2004; Singer et al. 2005).

Tumormarker wie CA 125 (v.a. bei serösen Ovarkarzinomen), CA 19-9 (v.a. bei muzinösen Ovarkarzinomen) und CA 72-4 sind aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität und mangelnden Spezifität für den Einsatz als Screeningverfahren nicht geeignet (Borges et al., 2004). Ihre Wertigkeit erhöht sich bei Kombination mit der transvaginalen Sonografie (Geisler et al., 2001). Dabei wird eine regelmäßige Untersuchung der CA 125 Serumspiegel nur für eine kleine Risikogruppe von Frauen empfohlen. Der Verlauf des Spiegels ist dabei von größerer Bedeutung als die einmalige Messung der CA 125 Werte. Kommt es zu einem steten Ansteigen des Spiegels, so wird eine Ultraschalluntersuchung durchgeführt (Sharp et al., 1997). Hierbei wird eine höhere Diagnosesicherheit durch die Anwendung spezieller Scoresysteme zur Bewertung suspekter Raumforderungen erreicht. Durch die Kombination beider Methoden ist häufig eine Unterscheidung nicht maligner Zysten von verdächtigen Befunden möglich. CA 125 hat zudem Bedeutung in der postoperativen Phase. Bei Patientinnen mit präoperativ hohem CA 125-Serumspiegel hat ein rascher postoperativer Abfall hohe prognostische Relevanz (Verri et al., 2005).

Die definitive Diagnose eines Ovarialkarzinoms wird an dem im Rahmen eines operativen Eingriffs gewonnenen Gewebe gestellt. Bei Einhaltung dieses dargestellten Regimes ergibt sich dann eine Rate von 1/10 Operationen mit positivem Karzinomnachweis (d.h. von 10 Operationen findet sich bei einer ein Karzinom) (Sharp et al., 1997). Ein zusätzlicher viel versprechender serologischer Marker scheint der Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 zu sein. Weitere Studien werden zur genaueren Einschätzung seiner Bedeutung benötigt (Geisler et al., 2001).

Genetische und molekulare Veränderungen finden sich in Ovarialkarzinomen in unterschiedlicher Frequenz. Überexpression des EGF Rezeptors ist häufig (Goff et al., 1996; Skirnisdottir et al., 2001; Dimova et al., 2006 u.a.). 50 % der fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinome weisen eine Mutation des p53 Tumorsuppressorgens auf (Eltabbakh et al., 1997, Schujer et al, 2003; Singer et al.

2005), 50 % der muzinösen Karzinome eine Mutation des k-ras Onkogens. Amplifikationen des c-myc Onkogens finden sich in bis zu 35% der Karzinome. Weitere Veränderungen sind beschrieben (Sharp et al., 1997; Berchuk et al., 1997; Geisler et al., 2001). Diese Veränderungen sind keineswegs spezifisch für Ovarialkarzinome, sondern sind mit unterschiedlicher Frequenz in vielen epithelialen Tumoren nachweisbar und übernehmen eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese. Im Kontext molekular-genetischer Veränderungen sind auch Ovarialkarzinome bei familiärer Belastung zu erwähnen. Als hereditäre Ovarialkarzinome werden etwa 10% der malignen epithelialen Ovarialtumoren bezeichnet. Sie treten im Rahmen des „breast and ovarian cancer syndroms“ (BOC) oder assoziiert mit dem „hereditären non polyposis colon cancer syndrom“ (HNPCC) auf. Beiden Erkrankungen liegen Keimbahnmutationen zugrunde. Im ersten Beispiel handelt es sich um eine Mutation des BRCA 1 oder 2 Gens, im zweiten Fall um Mutationen in Mismatch-repair-Genen, die zu Mikrosatelliten-Instabilität führen (Sharp et al., 1997). Interessant ist die Tatsache, dass das BRCA 1 Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17(q21) lokalisiert ist – ebenso wie das in dieser Arbeit untersuchte Her-2/*neu* Gen.

Die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms ist die Operation. Extirpation mit histologischer Tumorfreiheit (R0) ist ein wichtiger prognostischer Faktor. Adjuvant wird eine platinhaltige Chemotherapie empfohlen. Mit Einführung dieser zusätzlichen Therapie konnte eine gewisse Verlängerung in Bezug auf das Gesamtüberleben erreicht werden. Zusätzlich sind in den letzten Jahren Taxane in der primären Systemtherapie zugelassen (Bookman et al., 2005). Die Prognose der Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte durch die Einführung neuer Stoffklassen zwar verbessert werden, doch noch immer ist die Lebenserwartung von Patientinnen gerade in fortgeschrittenen Tumorstadien schlecht.

Intensiv wurde in den letzten Jahren nach neuen Therapieoptionen gesucht. Da die operativen Möglichkeiten nahezu ausgeschöpft sind, liegt der Schwerpunkt der Forschung auf konservativen Therapieansätzen. Tumorspezifische Oberflächenmarker stellen eines der Angriffsziele dar. Durch die Entwicklung entsprechender Antikörper kann der Tumor selektiv erkannt werden. Dabei werden unterschiedliche Konzepte verfolgt. In der Erprobungsphase sind mit einem β -Strahler (z.B. J131) radioaktiv markierte Antikörper, die zu einer zielgerichteten Strahlentherapie eingesetzt werden könnten. Dazu wurden erste in vitro Ergebnisse veröffentlicht

(Zalutsky et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit ist die Kopplung von chemotherapeutisch wirksamen Stoffen an diese Antikörper mit dem Ziel einer „selektiveren“ systemischen Therapie.

In Hinblick auf den Her-2/*neu* Rezeptor steht die Hemmung der eigentlichen Funktion des Oberflächenproteins durch den Antikörper im Vordergrund des therapeutischen Effekts. Das antigene Protein erfüllt Rezeptorfunktion als Wachstumshormonrezeptor, wird durch Anlagerung des therapeutischen Antikörpers an die Ligandenbindungsstelle gehemmt und die Signalübertragung und damit die Wachstumsstimulation unterbrochen.

Nahe liegend ist hierbei der Einsatz eines bereits etablierten und in der Klinik erfolgreichen Antikörpers wie Herceptin® (=Trastuzumab). Dieser humanisierte monoklonale Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des Her-2/*neu*-Wachstumsfaktorrezeptors gerichtet ist, ist seit 2000 in der Therapie des Her-2/*neu* positiven metastasierten Mammakarzinoms zugelassen. Der Einsatz dieses Antikörpers bei Ovarialkarzinomen würde eine neue Therapieoption für diese Tumoren eröffnen.

Voraussetzung für eine sinnvolle Anwendung von Herceptin® bei Ovarialkarzinomen ist der Nachweis einer Her-2/*neu* Genamplifikation bzw. Rezeptorüberexpression an diesen Tumoren. Vor einem breiten Einsatz dieses Medikaments wäre eine möglichst hohe Frequenz dieser Veränderung sowie eine Assoziation dieses Faktors zum Überleben nachzuweisen (Her-2/*neu* als unabhängiger prognostischer Faktor).

Die bislang zu diesem Thema veröffentlichten Daten und Arbeiten sind zahlreich (Slamon et al., 1989; Berchuk et al., 1990; Press et al., 1990; Rubin et al., 1993 und 1994; Makar et al., 1994; Fajac et al., 1995; Medl et al., 1995; Meden et al., 1997; Afify et al., 1999; Skirnisdottir et al., 2001; Hellström et al., 2001; Høgdall et al., 2003; Verri et al., 2005). Ein einheitliches Bild bezüglich der Rolle von Her-2/*neu* bei malignen epithelialen Ovarialtumoren ist aber nach wie vor nicht vorhanden. Zu sehr widersprechen sich die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten, sowohl was die Frequenz von Her-2/*neu* Amplifikation und Überexpression betrifft, wie auch die Beziehung einer solchen Veränderung zu Tumorstadium, Überleben, histologischem Differenzierungsgrad und histologischem Tumortyp.

1.2 Maligne Müller`sche Mischtumoren

Maligne Müller`sche Mischtumoren werden auch unter dem Begriff Karzinosarkome oder maligne gemischte mesodermale Tumoren geführt. Eine Ableitung von dem ovariellen Müllerschen Deckepithel erscheint möglich und somit eine Verwandtschaft mit den oben beschriebenen Ovarialkarzinomen. Im Vergleich zu diesen ist die Prognose der Patientinnen mit Karzinosarkom signifikant schlechter (Brown et al., 2004). Die Bezeichnung Karzinosarkom spiegelt das histopathologische Erscheinungsbild dieser aggressiven Tumoren wieder. Sie zeichnen sich durch eine extreme heterogene Morphologie aus. Neben epithelialen Abschnitten finden sich immer auch sarkomatöse Anteile. Die Entstehung bzw. Beziehung der beiden Komponenten zueinander ist umstritten, unterschiedliche Theorien werden diskutiert; die Kollisionstheorie unterstellt zwei synchron entstehende Tumoranteile (biklonaler Tumor); die Kombinationstheorie geht von einer gemeinsamen Stammzelle aus, die sich in die beiden Differenzierungsrichtungen entwickelt (monoklonaler Tumor). Die Konversionstheorie vermutet eine metaplastische Transformation einer (monoklonalen) neoplastischen Zelle in eine andere (Navarini et al., 2006). Außerdem wird eine zweite Variante der Kombinationstheorie diskutiert, nach der die mesenchymale, sarkomatoide Komponente eine Reaktion auf die Karzinomzellen darstellt.

Verschiedenste genetische Aberrationen wurden für diesen Tumortyp bereits beschrieben. Dazu gehören u.a. eine Inaktivierung des X-Chromosoms sowie Mutationen des p53 Onkogens und Mikrosatelliteninstabilität (Jin et al., 2003).

Die Suche nach Veränderungen des Her-2/*neu* bei Müller`schen Mischtumoren ist doppelt begründet. Informationen über den genetischen Hintergrund von Tumoren helfen, die Wachstums-eigenschaften besser zu verstehen. Bei Nachweis einer Her-2/*neu* Genamplifikation wäre zusätzlich ein Behandlungsversuch mit dem Antikörper Trastuzumab denkbar. Aus diesem Grund wurden auch 14 maligne Karzinosarkome in dieser Arbeit untersucht.

1.3 Granulosazelltumoren

Granulosazelltumoren gehören mit Theka-, Sertoli- und Leydigzelltumoren zu den so genannten Keimstrang-Stromatumoren der Gonaden. Sie machen etwa 5-10% der ovariellen Neoplasien aus und leiten sich von dem differenzierten endokrin aktiven Gonadenmesenchym ab. In der Mehrzahl sind diese Neoplasien benigne und fallen in einem Drittel der Fälle durch ihre übermäßige Hormonproduktion (Östrogen, Progesteron, Testosteron u.a.) auf. Das maligne Potential von Granulosazelltumoren ist im Rahmen der Erstdiagnose schwierig abzuschätzen. Das Fehlen von Mitosen und Atypien wird als Hinweis auf ein benignes Verhalten gewertet, niedriges Tumorstadium und fehlende Kapselruptur gelten ebenfalls als prognostisch günstig. Endgültige Klarheit über Benignität oder Malignität ist jedoch bisweilen erst retrospektiv anhand des jahre- bis jahrzehntelangen Verlaufs zu erreichen (Gutschow et al., 2004).

Vor diesem Hintergrund ist es von großem Interesse, nach möglichen Markern zu suchen, die bereits am Primärgewebe eine bessere Auskunft über das biologische Verhalten des Tumors geben könnten. Unter dieser Fragestellung wurden 20 Granulosazelltumoren in die vorliegende *Her-2/neu* Studie aufgenommen.

1.4 *Her-2/neu*: Molekulare Grundlagen und Bedeutung

Protoonkogene sind regulär in einer Zelle vorkommende Gene, deren Expressionsprodukte vor allem Proliferation, Mobilität und Differenzierung einer Zelle regulieren. Durch Veränderung in Struktur, Anzahl oder Expression kommt ihnen eine spezielle Rolle in der Entwicklung maligner Tumoren zu. Die so entstehenden Onkogene verleihen der Tumorzelle einen Wachstums- und Selektionsvorteil gegenüber der Umgebung. Bis zum heutigen Tag sind etwa 200 Protoonkogene bekannt. Diese können nach dem Wirkort des durch sie codierten Onkoproteins eingeteilt werden. Man unterscheidet Onkoproteine mit Rezeptorfunktion an der Zelloberfläche (Beispiel: *Her-2/neu*), Onkoproteine mit Funktion in der intrazellulären Signalvermittlung (Beispiel: Ras-Familie, ABL) sowie Onkoproteine als nukleäre Transkriptionsfaktoren (Beispiel: myc-Familie, fos). Verschiedene Mutationen eines Protoonkogens sind möglich um es zu einem

Onkogen zu machen. Punktmutationen in regulatorischen Genabschnitten können bereits durch Veränderung des Onkogenproduktes zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen. Eine solche Punktmutation lag z.B. bei der Erstbeschreibung des *Her-2/neu* Gens an induzierten Neuroglioblastomen von Ratten vor und führte zu einer stark erhöhten, Liganden unabhängigen, unkontrollierbaren konstitutiven Aktivität des *Her-2/neu* Rezeptors (Shih et al., 1981; Bargmann et al., 1986, Ullrich et al., 1990). Durch Translokation kann eine regulierende Sequenz in ein Protoonkogen eingeschleust und so ein verändertes Wachstumsverhalten der Zelle verursachen. Beispiel für eine mutagene Translokation ist t(8;14) des *c-myc*-Onkogens beim Burkitt-Lymphom. Eine weitere Möglichkeit der Mutation ist die Amplifikation eines Protoonkogens, das durch die rein quantitative Veränderung seines Proteinproduktes proliferationsfördernde Eigenschaften entwickelt. Das Proteinprodukt entspricht hierbei dem „Wildtyp“-Protein. Als Beispiel sei hier auf das *Her-2/neu* Gen und somit auf den Gegenstand der vorliegenden Arbeit hingewiesen.

Das *Her-2/neu* Gen (Synonym *erbB-2*) liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17(q21). Es codiert für ein 185 kiloDalton (kDa) großes, 1255 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein, das in der Zellmembran lokalisiert ist (Yarden, 2001). Die extrazellulär gelegene Domäne übernimmt Ligandenbindungsfunktion. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Rezeptors zu dem als ersten beschriebenen humanen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR = **E**pidermal **G**rowth **F**aktor **R**ezeptor = Her 1) werden diese Rezeptoren zu einer Her-Familie (**H**uman-**E**GF-**R**ezeptor) zusammengefasst, zu der beispielsweise auch Her 3 und Her 4 gehören (Coussens et al., 1985; Bargmann et al., 1986). Als Ligand kommt Heregulin in Frage. Dieses 45kDa große Protein ist seit 1992 bekannt und besitzt die Fähigkeit, die Tyrosinkinase von *Her-2/neu* zu stimulieren (Wallasch et al., 1995; Reese et al., 1997).

Nicht alle Funktionen und Interaktionen des *Her-2/neu* Rezeptors sind vollständig entschlüsselt. Der Rezeptor schwimmt in der Zellmembran frei beweglich. Alleine ist er jedoch nicht in der Lage den Liganden Heregulin zu binden. So bildet er funktionelle Dimere mit anderen Rezeptoren der gleichen Rezeptor-Familie vor allem mit Her3, aber auch mit Her4 oder EGFR (=Her 1). Diese Heterodimere zeigen eine hohe Affinität zu Liganden. Nach Bindung des Liganden an das

Rezeptorheterodimer kommt es zur Phosphorylierung der Her-2/*neu*-Tyrosinkinase und zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade (Reese et al., 1997).

Ist Her-2/*neu* auf der Zelloberfläche vermehrt exprimiert, so steigt die Wahrscheinlichkeit der Heterodimerisierung deutlich an. Außerdem kommt es durch eine erhöhte Stabilität der Her-2/*neu*-haltigen Heterodimere, durch eine verringerte Dissoziation des Liganden und durch eine verringerte Endozytoserate zu einer Verstärkung und Verlängerung der Aktivierung der Signalkaskade (Yarden, 2001). Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Her-2/*neu*-Homodimeren aus zwei Her-2/*neu* Rezeptoren. Diese Komplexe zeigen konstitutive Aktivität.

Abgesehen von den unterschiedlichen möglichen extrazellulären Bindungsvorgängen kommt es intrazellulär zu den stets gleichen Abläufen (vgl. Abb.1).

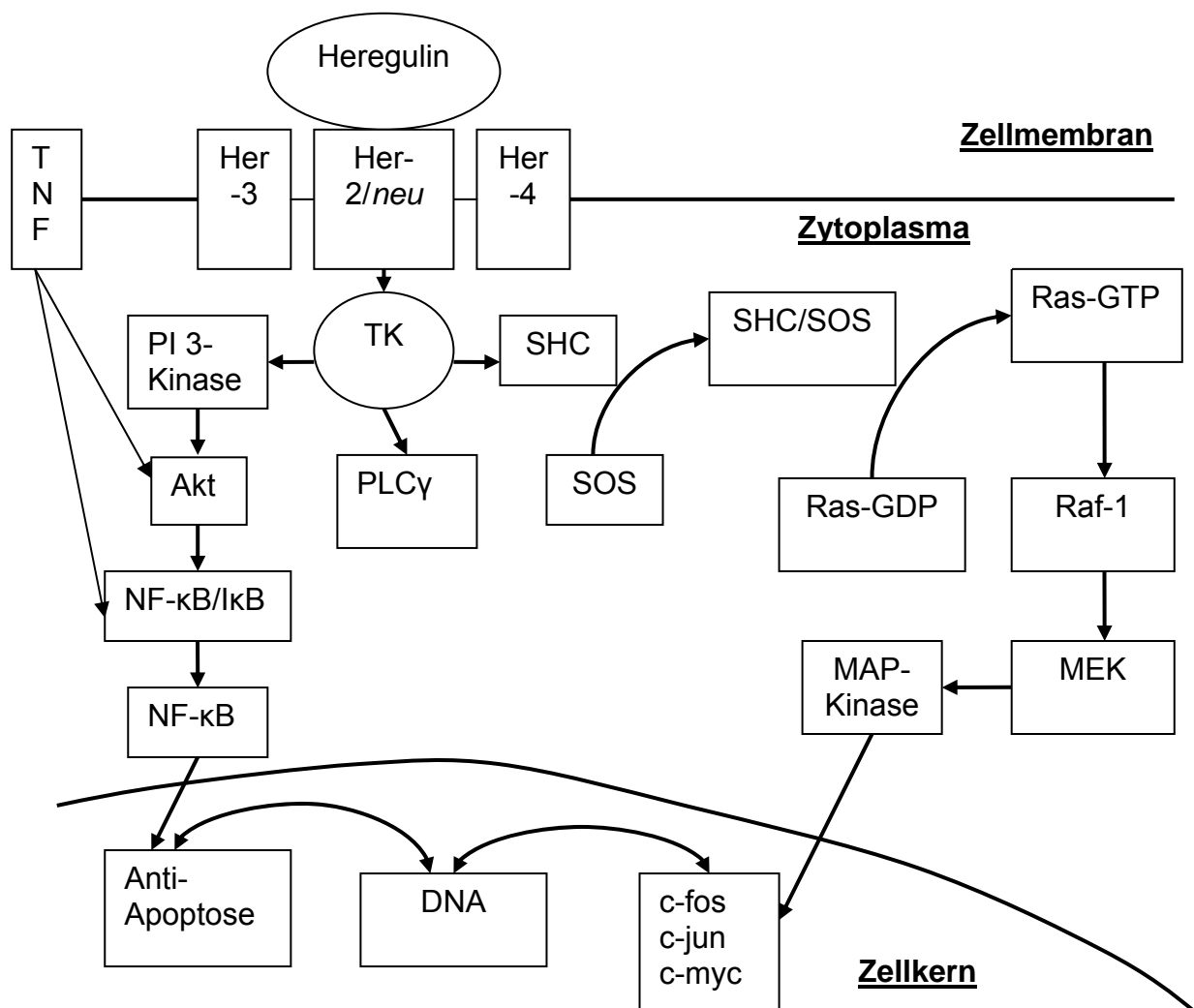


Abbildung 1: Signalkaskade Her-2/*neu* modifiziert nach

Ullrich et al., 1990; Reese et al., 1995; Wallasch et al., 1995 und Zhou et al., 2000

In Folge des Cystinreichtums der extrazellulären Anteile des Her-2/*neu* Rezeptors kommt es zur Ausbildung zahlreicher Disulfidbrücken, die dem Protein seine charakteristische Tertiärstruktur verleihen und so für die Selektivität des Liganden sorgen. Durch Bindung des Liganden kommt es zur Konformationsänderung der amphipathischen transmembranen Komponente und der intrazellulären Domäne. Diese erhält dadurch katalytische Aktivität. Es kommt zur Phosphorylierung und zur Aktivierung der am Carboxylende des Proteins liegenden Tyrosinkinase. Ein bekanntes Beispiel eines mittels eines Tyrosinkinase-Rezeptors weitergeleiteten Signals ist die Bindung des Insulins an seinen Rezeptor.

Die aktivierte Tyrosinkinase ist in der Lage, ihrerseits eine Reihe von second messenger-Proteinen durch Phosphorylierung zu aktivieren bzw. in ihrer Aktivität zu modulieren. Unter anderem erfolgt Ras-Protein vermittelt die Aktivierung der MAP-Kinase. Ras-Proteine sind ihrerseits wiederum bekannte Onkogene, die in die Genese zahlreicher maligner Tumoren, z.B. des duktales Adenokarzinoms des Pankreas, von Adenokarzinomen des Kolon und anderen involviert sind. Außerdem finden sich Ras-Mutationen in verschiedenen Ovarialkarzinomen, vor allem in muzinösen Ovarialkarzinomen.

Während in diesen Fällen Punktmutationen des Ras-Protoonkogens zu einer Störung der normalen Regulierbarkeit des Signalweges führen, kommt es im Gegensatz hierzu bei einer Her-2/*neu* Amplifikation zu einer Hochregulation der regulären Ras-MAP-Kinase-Signalkaskade. Weiterhin scheinen die Phosphokinase C und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) eine Rolle in der Signaltransduktion von Her-2/*neu* zu spielen. PI3K ist möglicherweise auch verantwortlich für die erhöhte Resistenz Her-2/*neu* Gen amplifizierter Zellen gegenüber Tumornekrosefaktor (TNF) vermittelten körpereigenen Abwehrmechanismen. Die TNF induzierte Zellapoptose wird bei übermäßiger Stimulation des Her-2/*neu*-Signalweges nicht ausgeführt (Zhou et al., 2000). Die Möglichkeit des Körpers, Tumorzellen selbständig abzutöten ist dadurch reduziert.

Ziel der second- und third-messenger-Proteine ist die Modulation von nukleären Transkriptionsfaktoren. Hierdurch wird die Expression von Genen wie c-fos, c-jun oder c-myc reguliert, die in der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation Schlüsselrollen einnehmen (Ullrich et al., 1990).

In den meisten Fällen handelt es sich bei menschlichen Tumoren nicht um Translokationen oder um einen Basenaustausch innerhalb des Her-2/*neu* Gens mit

einem entsprechend veränderten Rezeptor, der zu einer gesteigerten Aktivität führt. Diese Form der Mutation fand sich in chemisch induzierten Neuroglioblastomen in Ratten, in denen das Her-2/*neu* Gen 1982 entdeckt wurde. In diesen Experimenten führte eine einzige Punktmutation im Bereich der transmembranalen Region des Her-2/*neu* Rezeptors durch die Bildung konstitutiv aktiver Rezeptoren zu einer onkogenen Transformation (Shih et al., 1981; Bargmann et al., 1986).

Heute ist klar, dass die Bedeutung des Her-2/*neu* Gens z.B. beim Mammakarzinom auf die Amplifikation bzw. auf die Überexpression des intakten Wildtyp-Gens bzw. – Rezeptors zurückzuführen ist (Reese et al., 1997) und dass diese Genamplifikation mit der Transformation der Zelle in eine Karzinomzelle assoziiert ist (Hudziak et al., 1987). Eine Amplifikation des Her-2/*neu* Gens geht dabei mit einer 3 - 45-fachen Zunahme der Rezeptordichte in der Zellmembran einher (Benz et al., 1992).

1.5 Her-2/*neu*: Nachweismethoden von Rezeptor und Gen

Zahlreiche verschiedene Nachweismethoden sind für Her-2/*neu* entwickelt worden. Sie unterscheiden sich in der nachgewiesenen Zielstruktur auf der einen und im verwendeten Probenmaterial auf der andern Seite.

Durch Southern-blotting (Slamon et al., 1989 u.v.a.), quantitative DNA-PCR (Medl et al., 1995) und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (Afify et al., 1999) kann die Zahl an Her-2/*neu*-Genkopien quantifiziert werden. Durch Northern-blotting (Press et al., 1990) und quantitative reverse Transkriptase-PCR (rt-PCR) (Hengstler et al., 1999) wird die in der Zelle vorliegende spezifische mRNA gemessen. Western-blotting (Scoccia et al., 1998), Enzym-Immunoassay (= enzyme linked immunoabsorbet assay (=ELISA)), FACS (=fluorescence activated cell sorting) (Hellström et al., 2001) und Immunhistochemie (Høgdall et al., 2003) sind Methoden zur Darstellung des Her-2/*neu*-Rezeptors.

Für Blotting-Verfahren und PCR müssen DNA, RNA oder Proteine aus den Zellen extrahiert werden. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung und Analyse. Fluoreszenz-*in situ* Technik und Immunhistochemie hingegen stellen *in situ* Verfahren dar. Dabei kann die Färbereaktion spezifischen Zellen und Zellkomplexen zugeordnet werden.

In immunhistochemischen Reaktionen wird durch einen mono- oder polyklonalen Antikörper ein Teil des Proteins, bei Her-2/*neu* ein intra- oder extrazellulärer Rezeptoranteil, markiert und in einem weiteren Schritt z.B. über Peroxidasen farblich detektiert. Es erfolgt eine semiquantitative Auswertung der Anfärbung der Zellmembran und Einordnung der Ergebnisse in testspezifische Scores.

Bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wird das Her-2/*neu* Gen auf dem Chromosom 17 dargestellt. Die Genkopien werden quantifiziert und nach einheitlichen Kriterien die Fälle als „amplifiziert“ bzw. „nicht amplifiziert“ kategorisiert. Die FISH hat den Vorteil, dass die Anzahl der Signale eindeutig gezählt und somit quantifiziert wird. Im Unterschied dazu unterliegt die Auswertung der Immunhistochemie stärker subjektiven Einflüssen (Bilous et al., 2003).

Immunhistochemie und FISH haben sich in der Diagnostik weitgehend durchgesetzt. Der große Vorteil ist die standardisierte Anwendung und Auswertung, sowie die zuverlässige Durchführbarkeit der Untersuchungen an Formalin fixiertem, Paraffin eingebettetem archiviertem Gewebe.

1.6 Her-2/*neu* beim Mammakarzinom

Erstmals beschrieben wurde das Her-2/*neu* Gen durch Shih und Mitarbeiter 1981. In chemisch induzierten Neuroglioblastomen bei Ratten schrieben sie dem Gen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese zu (Shih et al., 1981; Bargmann et al., 1986). Dabei führten sie die onkogene Fähigkeit auf eine einzige Punktmutation des Gens zurück. Es folgte der Nachweis des nicht mutierten, jedoch amplifizierten Gens in verschiedenen Tumoren.

1985 veröffentlichten King et al. Ergebnisse über die Amplifikation des erbB2-Gens an der MAC117 Mammakarzinom-Zelllinie. 1987 folgte durch Slamon et al. der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Amplifikation des Her-2/*neu* Gens und kürzerem rezidivfreiem Intervall sowie Gesamtüberleben von Mammakarzinom-Patientinnen. Dieser Zusammenhang bestätigte sich in zahlreichen Folgestudien (Slamon et al., 1989; Gusterson et al., 1992; Sheshadri et al., 1993; Press et al., 1997; Reese et al., 1997). Seither gilt der Nachweis einer Her-2/*neu* Genamplifikation beim primären Mammakarzinom neben Lokalisation, Tumor-

stadium, Hormonrezeptorstatus und Lymphknotenstatus als zusätzlicher unabhängiger Prognosefaktor.

Auf den Nachweis des Gens und seiner prognostischen Bedeutung folgte die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers. Seit August 2000 ist der Einsatz des rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörpers (IgG kappa) Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann LaRoche, 79630 Grenzach-Wyhlen, Deutschland) als Monotherapie oder in Kombination mit Taxanen (Paclitaxel, Docetaxel) in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms in der EU zugelassen. Diese Therapie stellt eine wesentliche Erweiterung der Behandlungsmöglichkeiten dar. Vorteil der Antikörpertherapie ist eine erhöhte Spezifität und Sensitivität. Während eine systemische Chemotherapie potentiell alle hoch replikativen Körperzellen wie z.B. Myelopoese betrifft, richtet sich der Antikörper vor allem gegen die Zellen mit Überexpression des Rezeptors auf der Oberfläche. Hier hemmt er zum einen den Wachstumsstimulus, der über den Rezeptor vermittelt wird, zum anderen kann er eine T-Zell-getragene zelluläre Abwehrreaktion gegen die Antikörper-markierten Tumorzellen induzieren. Diese Art der Therapie sollte also erheblich nebenwirkungsärmer sein als die unselektivere systemische Chemotherapie.

Wie jedes verabreichte körperfremde Protein besitzt Herceptin® antigene Eigenschaften, die im ungünstigsten Fall zu einer anaphylaktischen Reaktion des Körpers führen können. Entsprechende Krankheitsbilder wurden bislang nur selten als Folge einer Herceptin®-Gabe beobachtet. Eine abgeschwächte Reaktion mit Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Erbrechen und Übelkeit zeigen ca. 40 % der Patientinnen insbesondere im Rahmen der Erstinfusion (Nebenwirkungen ersten und zweiten Grades). Gravierendere Symptome mit allgemeinen und insbesondere abdominalen Schmerzen und Dyspnoe sowie seltene hämatologische Komplikationen kommen bei ca. 14 % der Patientinnen vor und führen bisweilen zum Abbruch der Herceptin® Therapie (Nebenwirkung dritten Grades). Eine deutlich seltenere, jedoch schwerwiegende Nebenwirkung betrifft die kardiale Funktion, die sich bei ca. 5% der Patientinnen unter der Therapie verschlechtert (Cobleigh et al., 1999, Vogel et al., 2002). Die Antikörpertherapie ist daher für Frauen mit kardialer Dysfunktion nur eingeschränkt geeignet. Die Kombination von Herceptin® mit dem kardiotoxischen Doxorubicin ist aus diesen Gründen nicht zugelassen, andere Kombinationen werden derzeit getestet.

Die kombinierte Gabe einer platinhaltigen Chemotherapie mit Herceptin® geht mit einem verbesserten Ansprechen der Tumoren einher (Pegram et al., 1998). Es wird angenommen, dass durch den Einsatz von Herceptin® das Reparaturpotential der Tumorzelle herabgesetzt wird und so durch Alkylantien induzierte DNA-Brüche nicht mehr adäquat repariert werden können. Dies führt zu einem synergistischen Effekt beider Therapien bei einer mit der Monotherapie vergleichbaren Toxizität. Additive Effekte sind ebenfalls u.a. für Methotrexat beschrieben worden (Pegram et al., 1999). Im Gegensatz dazu scheint eine Her-2/*neu* Amplifikation mit einer gesteigerten Resistenz bzw. zumindest einem verringerten Nutzen gegenüber einer Behandlung mit Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil sowie Tamoxifen einherzugehen (Piccart et al., 2001).

Voraussetzung für den Einsatz von Herceptin® ist der Nachweis einer hohen Rezeptorexpression durch Immunhistochemie, bzw. der Nachweis einer Genamplifikation durch FISH. In der Standarddiagnostik wird derzeit eine Kombination beider Methoden angewandt (vgl. Abb. 2).

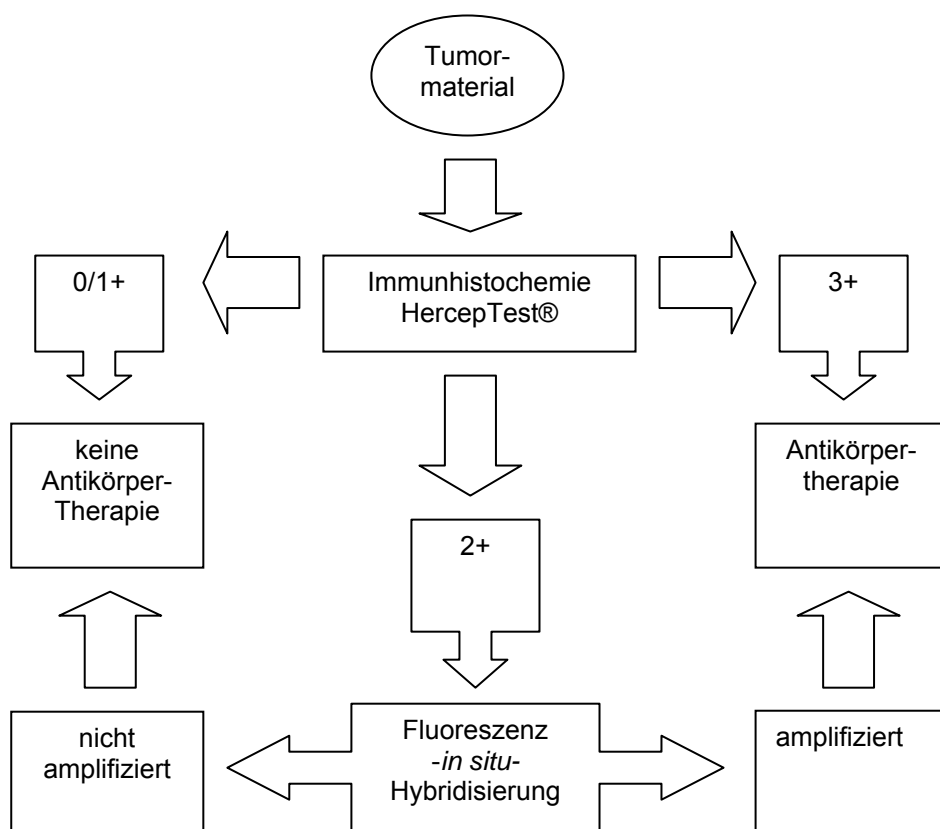


Abbildung 2: Diagnostische Regime am Mammakarzinom

(Lebeau et al., 2001; Schnitt et al., 2001; Bilous et al. 2003)

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass Tumoren, die in der Immunhistochemie eine starke membranöse Anreicherung (3+) zeigen, in der FISH in annähernd 100 % der Fälle eine Amplifikation besitzen. Umgekehrt verhält es sich mit Tumoren mit niedrigem Bewertungslevel (0/1+). Hier zeigte sich keine Vermehrung des Her-2/*neu* Genmusters. Eine Zwischenstellung kommt den immunhistochemisch mit 2+ bewerteten Tumoren zu. Da diese in 25% der Fälle eine Amplifikation des Her-2/*neu* Gens aufweisen, ist für diese Gruppe von Tumoren eine ergänzende Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung notwendig (Schnitt et al., 2001). Dieses Vorgehen begründet sich aus der Tatsache, dass nur die Patientinnen von einer Antikörpertherapie profitieren, die tatsächlich eine Veränderung auf Genebene aufweisen (Pauletti et al., 2000). Studien haben bestätigt, dass die Gruppe von Patientinnen, deren Therapieindikation aufgrund einer mäßig bis stark positiven Immunhistochemie (2+/3+) gestellt wurde, schlechter auf die Antikörper ansprach als eine Patientinnengruppe, die ausschließlich Fälle mit einer stark positiven Immunhistochemie (3+) umfasste (Baselga 2001).

Her-2/*neu* Genamplifikation und Proteinüberexpression finden sich in unterschiedlicher Frequenz auch in zahlreichen anderen epithelialen Tumoren. Beispiele sind u.a. Karzinome der Lunge mit einer Amplifikationsfrequenz von 34 % (Kern et al., 1994) und des Magens mit einer Frequenz von 12 % (Yonemura et al., 1991), Endometriumkarzinome mit 10 % (Berchuck et al., 1991), Karzinome der Speicheldrüse mit 38% (Press et al., 1994a) und der Harnblase mit 28 % (Jimenez et al., 2001), wobei unterschiedliche Autoren zu den unterschiedlichen Tumoren unterschiedliche Amplifikationsfrequenzen beschreiben. Prognostische Relevanz der Genveränderung wurde in den genannten Studien für das Magenkarzinom und Speicheldrüsenkarzinome, nicht jedoch für das Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Die Meinungen diesbezüglich sind jedoch wie auch beim Ovarialkarzinom Studie uneinheitlich.

1.7 Der Tissue Microarray

Der Tissue Microarray ist eine Technik, die eine simultane Untersuchung zahlreicher Gewebeproben ermöglicht. Dabei werden bis zu 1000 Probenzylinder in einen Standard-Paraffinblock eingesetzt, anschließend geschnitten und können so in

einem Untersuchungsschritt beurteilt werden. Der Tissue Microarray als Zeit und Kosten sparende Untersuchungsform mit hohem Kollektivumfang wurde vor dem Hintergrund immer größer werdender Datenmengen von der Arbeitsgruppe um Kononen entwickelt (Kononen et al., 1998). Diese Daten stammen häufig aus Analysen von Tumorgewebe mit Hilfe von RNA- und DNA-Microarrays, die die Erfassung von mehreren Tausend verschiedenen Genveränderungen ermöglichen (Schummer et al., 1999; Hough et al., 2000). Durch diese Technik werden Genprofile von Tumoren ermittelt (Wang et al., 1999). Dies erfolgt jedoch nur an einer kleinen Zahl von Gewebeproben. In einem nächsten Schritt muss dann die Frequenz, mit der diese herausgefilterten Genveränderungen in einem spezifischen Tumor auftreten, analysiert werden. In Bezug auf maligne Tumoren ist es nötig, Gewebeproben von unterschiedlichen histomorphologischen Untergruppen, Stadien und Differenzierungsgraden miteinander zu vergleichen, um die Bedeutung einer molekularen Veränderung besser einzuschätzen.

An diesem Punkt setzt der Tissue Microarray an. Durch Einbettung einer großen Zahl von Gewebeproben in einen Paraffinblock ist die zeitgleiche Untersuchung der Proben auf nur einem Objektträger möglich. Dies spart Zeit und Kosten (Milanes-Yearsley et al., 2002). Zugleich können von einem einmal angefertigten Tissue Microarray zahlreiche Folgeschnitte hergestellt werden. Die Technik eignet sich vor allem für retrospektive Untersuchungen großer archivierter Kollektive. In den vergangenen 5 Jahren wurden zahlreiche Arbeiten dazu veröffentlicht (Schraml et al., 1999; Moch et al., 1999 und 2001; Camp et al., 2000 und 2003).

2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zur Beantwortung folgender Fragen beizutragen:

- Wie hoch ist die Amplifikationsrate des *Her-2/neu*-Gens in verschiedenen Tumoren des Ovars, mit besonderer Beachtung der epithelialen Tumoren?
- Welche Aussagekraft besitzen Immunhistologie und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Tissue Microarrays von Ovarialkarzinomen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dieser Genaberration und etablierten prognostischen Faktoren von malignen epithelialen Ovarialtumoren?
- Wie gut ist die Korrelation zwischen der Immunhistologie (HercepTest®) und FISH zum Nachweis einer *Her-2/neu* Veränderung?
- Ist eine Therapie von Ovarialkarzinomen mit dem Antikörper Trastuzumab vor diesem Hintergrund sinnvoll?

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die verwendeten Fälle wurden dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen. Es handelte sich um Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material der Jahre 1985 bis 2002. Das Kollektiv setzte sich aus Fällen, die vom Tumorregister München erfasst worden waren, sowie aus Fällen eines institutsintern geführten Registers von Ovartumoren zusammen. Die Auswahl der Fälle erfolgte unter Berücksichtigung des histologischen Typs, des Gradings sowie der Verfügbarkeit von Überlebensdaten. Ziel war es, ein möglichst vollständiges Spektrum der im Ovar vorkommenden Tumorentitäten zu erhalten. Daten und Material von 262 Patientinnen standen zur Verfügung.

Tabelle 1: Histologie, Grading und durchschnittliches Alter

Histologische Differenzierung	Anzahl	Ohne Grading				Alter
		G = 1	G = 2	G = 3		
Seröses Karzinom	136	12	51	73	61,5 (10-88)	
Endometrioides Karzinom	20	5	13	2	69 (36-87)	
Muzinöses Karzinom	12	8	3	1	62,5 (31-87)	
Klarzelliges Karzinom	5	0	1	4	59 (37-77)	
Seröser LMP	19	19			54,4 (27-88)	
Endometrioider LMP	1	1			69	
Muzinöser LMP	16	16			59,4 (19-78)	
Granulosazelltumor	20	20			55,7 (6-78)	
Müller'scher Misch tumor	14	14			69,3 (28-91)	
Benignes Zystadenom	11	11			60,8 (33-82)	
Andere Tumoren	8	8			54,9 (14-78)	
Gesamt	262	89	25	68	80	60,7

(LMP = Low malignant potential = Borderline Tumor des Ovars)

Das Probenkollektiv wurde auf zwei Tissue Microarrays (=TMA) aufgeteilt. Der eine TMA-Block umfasste ovarielle Karzinome Grad 2 und 3 sowie benigne Zystadenome. Der andere Block beinhaltete Borderline Tumoren des Ovars (=LMP), ovarielle Karzinome Grad 1, Granulosazelltumoren, maligne Müller'sche Mischtumoren sowie drei Tubenkarzinome, ein Teratom, ein Dysgerminom, ein Leiomyosarkom, ein Fibrosarkom und ein gering differenziertes neuroendokrines Karzinom jeweils mit Primärlokalisierung im Ovar.

Informationen bezüglich Überlebensdauer und/oder Todesursache waren von 258 Patientinnen (98,5%) verfügbar, die fehlenden vier Fälle entsprechen drei Granulosazelltumoren und einem serösen Ovarialkarzinom, deren Beobachtungszeit zu kurz war.

Tabelle 2: Überleben und Todesursache der Patientinnen

	Todesursache			
	tumorabhängig	tumorunabhängig	nicht beurteilbar	überlebt
Anzahl der Fälle	50	4	68	136

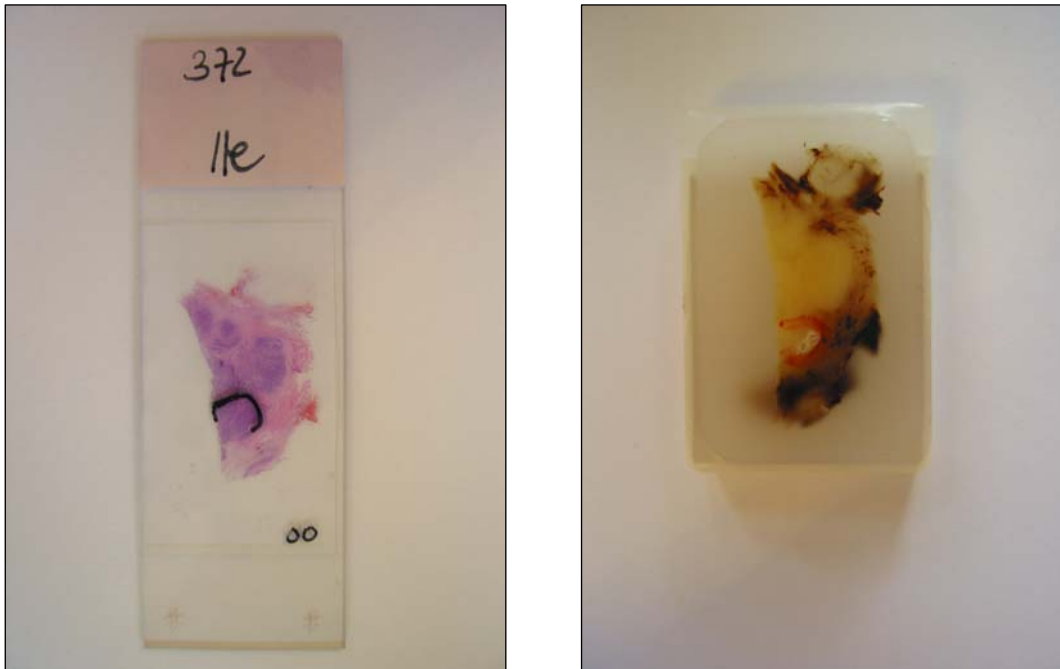
Die verwendeten Informationen wurden vom Tumorregister München zur Verfügung gestellt. Erhebungsdatum war der 12. März 2003. Als „nicht beurteilbar“ wurden Patientinnen geführt, die verstorben waren, deren Todesumstände aber keinen eindeutigen Schluss auf die Todesursache zuließen.

3.2 Auswahl der Präparate für die Materialentnahme

Nach Auswahl der Fälle wurden die zugehörigen HE-Schnittpräparate erneut begutachtet und der histologische Typ wie auch das zugehörige Tumorgrading nochmals überprüft. Dabei beschränkte man sich allein auf die Kernpolymorphie als Richtwert für das Grading. Zusätzlich wurden repräsentative Tumorregionen auf den Schnittpräparaten markiert, diese Markierung auf die entsprechenden Paraffinblöcke übertragen und unter Berücksichtigung der Paraffinblockqualität drei Blöcke als so genannte Spenderblöcke ausgewählt.

Abbildung 3:

Markierung des Stanzareals auf dem HE-Schnitt und Übertragung auf den Paraffinblock



3.3 Anfertigung der Tissue Microarray Blöcke

Die Anfertigung der Tissue Microarray Blöcke erfolgte mit dem MTA-1 (Micro Tissue Arrayer) von Beecher Instruments, Woodland, USA. Der Empfängerblock wurde im institutseigenen Labor aus thermostabilem Paraffin mit den Außenmaßen 30 x 20 x 10 mm hergestellt.

Im Folgenden wird die Organisation des Arbeitsplatzes, des Empfängerblockes sowie der Stanzapparatur kurz dargestellt.

Der Arbeitsplatz:

Hierzu zählen der vorgefertigte Plan mit der Anordnung der Spenderstanzen auf dem Empfängerblock (siehe Anhang), bereits mit den jeweiligen Koordinaten beschriftet und die Spenderblöcke mit den dazugehörigen HE-Präparaten in der durch das Koordinatensystem festgelegten Reihenfolge.

Der Empfängerblock:

Er besteht aus thermostabilem Paraffin. Vor Beginn der Arbeit wird er auf gleichmäßige Höhe, Reinheit des Paraffins und mögliche unter der Wachsoberfläche eingeschlossenen Luftblasen, die zum Brechen des Blockes

beim Stanzvorgang führen könnten, untersucht. Sollte der Block Blasen aufweisen, muss er ausgetauscht werden.

Die Stanzapparatur:

Hierzu gehört der Stanzapparat, mit nach oben und unten gleitender Stanzvorrichtung, die sich gegen leichten Widerstand zwischen Spender- und Empfängerblock umstellen lässt. Die magnetische Einspannvorrichtung für den Empfängerblock mit vorhandenen Fixierschrauben und entsprechend passenden Achtkantschlüsseln, eine Plastikbrücke für die Entnahme der Spenderstanze, sowie Stanznadeln in zwei Größen (Nadel zur Vorbereitung des Empfängerblockes mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm und Nadeln zur Entnahme des Spenderzylinders mit einem Innendurchmesser von 0,6 mm). Zusätzlich benötigt man jeweils Ersatznadeln, da sich die Nadelspitzen im Rahmen der Arbeit abnutzen und die Blöcke bei der Materialentnahme beschädigen.

Abbildung 4:

Der Manual Tissue Microarrayer I
(MTMA I)
der Firma Beecher Instruments



Zunächst wird der Empfängerblock in der dafür vorgesehenen Einspannvorrichtung mit Hilfe der Spannschrauben befestigt. Um schiefe Stanzen und daraus resultierende Überschneidungen in der Tiefe des Blockes zu vermeiden, muss der Block für den Stanzvorgang ausreichend fixiert sein. Ein zu starkes Einspannen birgt aber die Gefahr den Block zu sprengen.

Der im Metallzwinger fixierte Block wird nun in den dafür vorgesehenen Rechtwinkelrahmen eingelegt und durch im Boden eingebaute Magnete automatisch an dieser Stelle stabilisiert. Dann wird die Nadel der Stanze mit Hilfe von zwei Mikrometerschrauben, die die Nadel nach rechts und links sowie nach vorn und

hinten bewegen, in die Position über dem Block gebracht, an der der erste Zylinder eingesetzt werden soll. Die erste Stanze wurde im linken unteren Eck des Blockes eingesetzt, diese Reihe horizontal nach rechts vervollständigt und die nächste Reihe nach oben versetzt über der ersten Stanze begonnen.

Die Position der ersten Stanze sollte dabei so gewählt werden, dass sie mindestens ca. 2 mm vom Außenrand des Blockes entfernt liegt. Durch diese Grundeinstellung steht größtmöglicher Platz zu Verfügung wobei der Abstand zum Rand des Blockes die Gefahr des Berstens beim ersten Einstechen reduziert. Damit die geplante Länge und Höhe des Blockes nicht die tatsächliche Reichweite der Mikrometerschrauben übersteigt, muss bei der Erstpositionierung darauf geachtet werden, dass beide Mikrometerschrauben noch ausreichende Reichweite nach rechts und oben besitzen.

Ist die richtige Position der Nadel gefunden, werden die digitalen Anzeigen der Mikrometerschrauben auf diesen Punkt als den Nullpunkt geeicht. Dieser Nullpunkt wird während der Arbeit an dem Block nicht verändert. Ausgehend von diesem Punkt ist somit jede Stanzposition auf dem Block mit Hilfe der Mikrometerschrauben exakt aufzufinden.

Zunächst wird nun mit der im Querschnitt dünneren Nadel ein Paraffinzylinder aus dem Empfängerblock entnommen. Dazu wird die Nadel in senkrechte Position zum Block gebracht und dann mit etwas Kraft in den Block gedrückt. Die Eindringtiefe kann individuell gewählt werden. Die hier benutzte Einstellung mit einer resultierenden Eindringtiefe von etwa 5 mm hat sich bereits in früheren Arbeiten mit denselben Blockmaßen als praktikabel bewiesen und wurde für diese Arbeit übernommen.

Die Nadel wird noch im Paraffinblock leicht hin und her gedreht, um den Zylinder im Inneren der Hohlzylinder gut von Untergrund und umgebendem Paraffin zu lösen und anschließend mit Hilfe einer Feder wieder in die Ausgangsstellung zurückgezogen. Nun kann der Paraffinzylinder durch eine in das Lumen hineinragende Nadel aus der Hohlzylinder entfernt werden.

Im nächsten Schritt wird über den starr fixierten Empfängerblock die so genannte „Brücke“ gelegt. Diese Vorrichtung ermöglicht es, den Spenderblock an derselben Stelle zu bearbeiten wie zuvor den Empfängerblock.

Der Spenderblock wird mit der Hand auf der Brücke fixiert um mit der größeren Stanze aus dem zuvor markierten Bereich einen Zylinder zu entnehmen. Nach

Entfernung der Brücke wird die Stanznadel mit dem Gewebszylinders auf das obere Niveau des Empfängerblockes gebracht, und mit Hilfe der Innennadel das Gewebe langsam in das vorgefertigte Stanzloch eingesetzt. Hat das obere Ende des Zylinders das Oberflächenniveau des Empfängerblockes erreicht, ist der Vorgang beendet und alle Hilfsmittel werden wieder in die Ausgangsposition gebracht.

Nun wird die Anzeige der Mikrometerschraube, welche die Stanznadel nach rechts bewegt, auf 0,8000 mm eingestellt und der Vorgang mit dem nächsten Präparat wiederholt. Die Differenz zwischen dem Durchmesser der Stanznadel (0,6 mm) und dem gewählten Intervall der Mikrometerschrauben (0,8 mm) entspricht dem Abstand zwischen den einzelnen Stanzenrändern (0,2 mm). Der Abstand zwischen den einzelnen vier Quadranten beträgt 1,5 mm.

3.4 Schneiden und Färben

Beide Blöcke wurden für eine HE-Färbung, für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und für immunhistochemische Untersuchungen in der jeweiligen Dicke geschnitten.

3.4.1 HE-Färbung

Beide TMA-Blöcke wurden für die Hämatoxilin-Eosin-Standardfärbung in einer Dicke von 1-2 µm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

3.4.2 Immunhistochemischer HercepTest®

Der Antikörper des verwendeten HercepTests® (DAKO, Glostrup, Dänemark) markiert das extrazellulär gelegene C-terminale Ende des transmembranalen HER-2/*neu* Proteins.

Beide TMA-Blöcke wurden in einer Schichtdicke von 1 µm geschnitten und auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig Deutschland) aufgebracht. Zunächst wurden 100 µl 3% Hydrogenperoxid mit 15 mmol von NaN zur Peroxidaseblockade auf den Schnitt aufgetragen. Nach 5 min Inkubation und Reinigung mit Aqua dest. wurden 100 µl Lösung des Antikörpers gegen HER-2/*neu* mit 0,05 mol/L Tris/HCl, 0,1 mol/L NaCl sowie 15 mmol/L NaN₃ bei pH 7,2 dazugegeben. Nach 30 min Inkubation erfolgt eine Reinigung mit Wasch-Puffer. Der Schnitt wurde mit 100 µl Lösung aus Meerrettich-Peroxidase markierten Anti-

Kaninchen-Immunglobulinen, behandelt und wiederum für 30 min inkubiert und erneut mit Wasch-Puffer gereinigt. Anschließend wurde das Präparat mit 100 µl DAB (3,3'-Diaminobenzidin) versetzt, für 10 min inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gereinigt. Als letzten Schritt wurde das Präparat für 2-5 min in ein Hämatoxylinbad gegeben, um eine Gegenfärbung der Kerne zu erzeugen. Der Schnitt wurde von allen Resten des Hämatoxylin befreit. Zur Überprüfung der Zulässigkeit des Verfahrens wurde parallel eine Negativkontrolle angefertigt, die jeden Bearbeitungsgang ebenso durchlief wie das eigentliche Präparat, statt des Anti-Her-2/*neu* Antikörpers jedoch mit unselektiven Kaninchen-Antikörpern versetzt wurde.

3.4.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Der TMA-Block wurde für die FISH in einer Dicke von 2 µm geschnitten und auf gebräuchliche vorbeschichtete Glasobjektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig Deutschland) aufgebracht. Als Assay wurde PathVysion™ (Firma Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) verwendet.

Zur Entfernung des bei der Einbettung des Spenderblockes genutzten Paraffins wurden die Schnitte zunächst in reinem Xylol 3x10 min inkubiert, dann die Xylolreste mit 100 % Äthanol für 2x5 min ausgewaschen und die Objektträger luftgetrocknet. Daraufhin wurden 200-300 µl Natriumisothiozyanat auf den Schnitt geträufelt und ein Deckglas aufgebracht. Der so präparierte Objektträger wurde für 30 min bei 80°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde das Deckglas vorsichtig abgeschüttelt und der fixierte Schnitt mit Aqua dest. gespült. Daraufhin wurde das Präparat mit 200 µl Pepsinlösung versetzt, wiederum mit einem Glas abgedeckt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Deckglases wurde das Präparat mit Aqua dest. gespült. Nachdem der Schnitt an der Luft getrocknet war, wurde er zur Denaturierung der Proteinstrukturen für 20 min auf die Heizplatte gelegt. Unmittelbar darauf wurden zunächst ca. 20 µl DNA-Sonde auf den Schnitt aufgebracht, im vorliegenden Fall PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit (LSI® HER-2/*neu* SpectrumOrange™ und CEP® 17 SpectrumGreen™) und der Schnitt daraufhin luftblasenfrei mit einem Deckglas geschützt. Nach weiteren 10 min auf der 80°C Heizplatte wurde das Präparat mit Fixogum gesichert und in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C über Nacht hybridisiert. Am folgenden Tag wurde der Schnitt nach Entfernung des Deckglases in 42°C temperiertem Wasserpuffer,

bestehend aus 1 ml 20 x SSC (3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, pH 5,3) und 200 ml Aqua dest. für 3x10 min gewaschen. Es folgte eine weitere 5 minütige Inkubation des Präparats bei 42°C in BT-Puffer (3,1 g NaHCO₃ (Natriumbikarbonat) mit 0,05 g tri-Natriumcitrat x H₂O, 250 µl Tween 20 und 250 ml Aqua bidest.). Nachdem die Lösung gut vom Präparat abgetropft war, erfolgte als letzter Schritt das Auftragen von DAPI-Vectashield (1 ml Vectashield mit 1 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) und das wiederum blasenfreie Eindeckeln des Schnittes. Die vollständige Bearbeitung der Präparate für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nahm in etwa 26 Stunden in Anspruch.

Die Lagerung der fertigen FISH-Präparate erfolgte im Kühlschrank bei ~4°C um sie vor Lichteinfall zu schützen. So bearbeitet waren die Präparate je nach Belichtungsdauer bis zu ca. 1 Monat auswertbar.

3.5 Auswertung und Auswertungskriterien

3.5.1 HE-Färbung

Der Tumorgehalt jeder Stanze wurde im Lichtmikroskop beurteilt. Jede Stanze wurde mit entweder „viel Tumor vorhanden“ (Tumorgehalt einer Stanze über 30 %), „kein Tumor vorhanden“ oder nur „spärlich Tumor vorhanden“ (Tumorgehalt einer Stanze unter 30 %) bewertet. Stanzen ohne Tumorgewebe gingen nicht in die weitere Auswertung ein. Bei Stanzen mit nur fokaler Positivität in FISH oder HercepTest®, aber nur spärlichem Tumorgehalt in den HE-Präparaten wurden die fraglichen Areale miteinander verglichen. Waren das Tumorgewebe in der HE und die positiven Areale in den anderen Untersuchungen deckungsgleich, wurden diese Ergebnisse in die weitere Auswertung einbezogen.

3.5.2 Immunhistochemischer HercepTest®

Jede Stanze wurde im Lichtmikroskop bewertet. Als Auswertungsgrundlage dienten die Angaben des Herstellers DAKO und das vom Hersteller zur Verfügung gestellten Bildmaterial. Beurteilt wurde ausschließlich die Intensität der membranöse Farbreaktion, zytoplasmatische Anfärbung ging nicht in die Beurteilung ein.

Die Bewertungskriterien (HercepTest®-Score) lauteten wie folgt:

- 0 = Keine Anfärbung oder Anfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen

- 1+ = Schwache Anfärbung der inkompletten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen,
- 2+ = Schwache bis mäßige Anfärbung der kompletten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen
- 3+ = Starke Anfärbung der kompletten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen

Im Ergebnisteil werden die Werte des HercepTests® zunächst entsprechend der aufgeführten Einzelgruppen dargestellt. Bei der statistischen Berechnung wurden die Tumoren, wie in der Diagnostik üblich, mit Werten von 0 und 1+ zu einer Gruppe zusammengefasst. Tumoren mit 2+ oder 3+ wurden sowohl gemeinsam als auch getrennt voneinander betrachtet.

3.5.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Marke ZEISS (Oberkochen, Deutschland), Typ Axioskop mit Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO-100Watt der Firma OSRAM (Deutschland). Zur groben Orientierung auf dem Präparat wurden 100- und 270 fache Vergrößerung, zur Auswertung die 630 fache Vergrößerung mit Immersionsöl genutzt.

Für die differenzierte Auswertung der verschiedenfarbigen Signale standen Einfachbandpass-Filter von Dapi (zur Darstellung der Zellkerne und damit zur Beurteilung der Zellkerngrenzen), FITC (Green)-Einfachfilter (zur Darstellung der Zentromersignale bei einer Exzitationswellenlänge von 488nm) und TRITC(Orange)-Einfachfilter (zur Darstellung der Gensignale einer Exzitationswellenlänge von 546nm) zur Verfügung. Weitere Auswertungsmöglichkeiten waren Doppelfilterkombinationen aus FITC + TRITC sowie eine Triplefilterkombination aus FITC + TRITC + Dapi (Firma LEP (LUDL Electronic Products)). Die manuelle Steuerung der Filterräder erfolgte über die Tastatur MAC 5000 der Firma LEP. Die Auswertung der Signale orientierte sich an den Anweisungen des Herstellers des Sondenkits (Vysis/Abbott Downers Grove, IL, USA).

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nach Pauletti & al. (2001) mit folgenden Kriterien:

- Ein normaler Gensatz lag vor, wenn mehr als 90% der Zellkerne 4 Gensignale oder weniger aufwiesen.

- Eine schwache Amplifikation lag vor, wenn mehr als 10% der Zellkerne mehr als 4, aber weniger als 10 Gensignale aufwiesen und zugleich der Quotient aus allen Gensignalen und allen Zentromersignalen über 2 war.
- Eine hohe Amplifikation lag vor, wenn mehr als 10% der Zellkerne mehr als 10 Gensignale aufwiesen.
- Eine Polysomie lag vor, wenn mehr als 10% der Zellkerne mehr als 4 aber weniger als 10 Gensignale aufwiesen, der Quotient aus Gensignalen und Zentromersignalen aber nicht größer als 2 war und der Quotient aller Zentromersignale und ausgezählten Kernen über 3 war.
- Als Monosomie wurden Gensätze definiert, die in mehr als 50% der Fälle Kerne mit jeweils nur ein Gen- und Zentromersignal aufwiesen.
- Als Deletion wurden Gensätze definiert, die in mehr als 50% der Fälle Kerne mit einem Gen- aber zwei Zentromersignalen aufwiesen.
- Als Trisomie wurden Gensätze definiert, wenn mehr als 50% der Kerne jeweils drei Gen- und Zentromersignale zeigten.

Die Ergebnisse wurden in einem institutsinternen Auswertungsformular dokumentiert.

Es wurden nur einzeln liegende Kerne gezählt, die keine Überlappung mit einem anderen Kern zeigten. Gensignale, deren Abstand zueinander geringer war als der eigene Durchmesser wurden als so genannte „Splitsignale“ betrachtet und als ein Signal gewertet.

Weitere Berechnungen wurden erst angestellt, wenn eine entsprechende Zahl von Kernen (Kriterien wie oben genannt) mehr als vier Gensignale aufwies. Bei vier oder weniger Gensignalen pro Kern wurde davon ausgegangen, dass sich Zellen mit mehr als zwei Genkopien in der G₂- oder M-Phase des Zellzyklus befinden und daher zwar bereits eine Duplikation der DNA, aber noch keine Zellteilung stattgefunden hatte (Pauletti et al., 1996).

3.5.4 Statistische Auswertung

Dokumentation und statistische Auswertung erfolgte durch die SPSS software Version 11.5 und 13. Zur Anwendung kamen Kreuztabellen. Der log-rank Test wurde zur Berechnung der Signifikanzen benutzt. Die Berechnungen zum Überleben wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse (1958) angefertigt.

4. Ergebnisse

Die Tissue Microarray Blöcke ließen sich problemlos den Angaben des Herstellers entsprechend anfertigen. Wie auf den Lageplänen im Anhang gezeigt wurden die einzelnen Probenzylinder in die Empfängerblöcke eingesetzt.

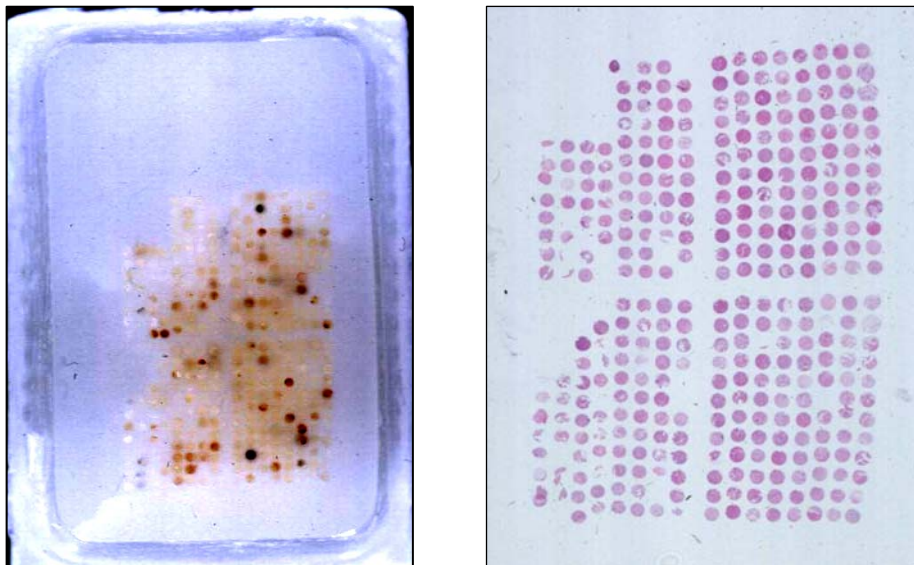


Abbildung 5:

Makroskopische Aufnahme des Tissue Microarray Block 1 nach Fertigstellung und makroskopische Aufnahme des Tissue Microarray Block 1 in HE-Färbung

Die Blöcke wurden standardmäßig geschnitten und auf die in der Routinediagnostik verwendeten vorbeschichteten Glasobjektträger (Superfrost, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Es wurde dabei kein Hilfssystem zur Anfertigung und Übertragung der Schnitte vom Mikrotom auf den Objektträger benutzt.

4.1 Auswertung des Tissue Microarrays in Bezug auf seine Qualität

4.1.1 Angefertigte Schnitte und Schnittdicken

Die TMA-Blöcke wurden für die geplanten Untersuchungen in der unten dargestellten Dicke und Anzahl geschnitten (vgl. Tab. 3). Zunächst wurden Schnitte à 4 µm des ersten Blockes für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) angefertigt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich jedoch, dass es aufgrund der zum

Teil hohen Kerndichte zu zahlreichen Kernüberlagerungen kam. Diese machten die Auswertung teilweise unmöglich. Die Schnittdicke wurde daher auf 2 µm umgestellt. Bei der Bearbeitung des zweiten Blockes wurde dies berücksichtigt und von Anfang an Schnitte mit 2 µm Dicke für die FISH hergestellt.

Tabelle 3: Dicke und Anzahl der angefertigten Schnitte

Block Nr.	Schnittdicke	Verwendung	angefertigte Schnittzahl	Gesamtdicke der angefertigten Schnitte
1	4 µm	FISH	10	~96 µm
	2 µm	FISH	14	
	1-2 µm	HE-Färbung	6	
	<2 µm	IHC	8	
2	2 µm	FISH	11	~38 µm
	1-2 µm	HE-Färbung	2	
	< 2 µm	IHC	6	

4.1.2 Qualität der Methode

Zur Beurteilung der Methode des TMA wurden drei Faktoren berücksichtigt: (1) der Tumorgehalt der Stenzen, der anhand der HE-Schnitte beurteilt wurde; (2) der Verlust an Stenzenmaterial, der bei allen drei Untersuchungen bewertet wurde; (3) die Auswertbarkeit der Immunhistochemie sowie der FISH. Diese Beurteilung erfolgte an der Absolutzahl der Stenzenpaare.

In der weiterführenden Auswertung für FISH und Immunhistochemie wurde pro Patientin immer die Stanze mit dem jeweils höchsten Testergebnis gewertet.

4.1.3 Tumorgehalt der einzelnen Stenzen und Verlust von Stenzenmaterial

Die HE-Präparate entsprachen jeweils der obersten Schnittebene der TMA-Blöcke und dienten der Bewertung des Tumorgehaltes. Jeder Fall war jeweils mit mindestens zwei Gewebstanzen in dem TMA-Block repräsentiert. 96,4% der Stenzenpaare wiesen in mindestens einer der beiden Stenzen Tumorgewebe auf. Diese Stenzen wurden für die spätere Auswertung auf dem jeweiligen TMA-Lageplan farblich markiert um sie später leichter aufzufinden.

Tabelle 4: Tumorgehalt der Stanzenpaare in der HE-Färbung

Qualität der Stanzen	Anzahl
Stanze nicht vorhanden	2 (0,7%)
Stanze ohne Tumorgewebe	9 (3,0%)
Stanze mit Tumorgewebe	292 (96,4%)
Gesamt	303

Von 303 Stanzenpaaren enthielten neun keine Tumorgewebe. Diese tumorfreien Stanzenpaare setzten sich aus fünf Zystadenomen ($5/11=45,5\%$), drei serösen Karzinomen ($3/136=2,2\%$) und einem malignen Müller'schen Misch tumor ($1/14=7,1\%$) zusammen. Damit stellte die Gruppe der Zystadenome den größten Teil der tumorfreien Proben (55,6%).

Im Rahmen der einzelnen Bearbeitungsschritte und der daraus resultierenden mechanischen und thermischen Beanspruchung kam es zum partiellen oder kompletten Verlust von Material. War mindestens eine Stanze des Stanzenpaares mit ausreichend Gewebe für eine Beurteilung erhalten, ging der Fall in die Auswertung ein.

Tabelle 5: Verlust von Proben in der HE-Färbung, der IHC und der FISH

Untersuchung	Stanze vorhanden	Stanze nicht vorhanden
HE-Färbung	301 (99,3%)	2 (0,7%)
Immunhistochemie	285 (94,1%)	18 (5,9%)
Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	281 (92,7%)	22 (7,3%)

4.1.4 Auswertbarkeit der verschiedenen Untersuchungen

Eine Einschränkung der Auswertbarkeit fand sich fast ausschließlich bei der FISH-Untersuchung. Die Auswertung limitierte sich durch die Qualität der Hybridisierungssignale. Nur bei (1) eindeutiger Zuordnung von Zentromer- und Gensignal an (2) solitär liegenden Tumorkernen sowie (3) guter Hybridisierung von (4) mindestens 50 Tumorzellkernen pro Stanze wurde eine Auswertung vorgenommen. Waren alle vier Bedingungen bei mindestens einer Stanze eines Stanzenpaares erfüllt, ging die Probe in die Auswertung ein.

Tabelle 6: Auswertbarkeit der Stanzepaare in der HE-Färbung, der IHC und der FISH

Untersuchung	Stanze auswertbar	Stanze nicht auswertbar	Gesamt
HE-Färbung	301 (100%)	0	301
Immunhistochemie	284 (99,6%)	1 (0,4%)	285
Fluoreszenz in situ Hybridisierung	250 (89,0%)	31 (11,0%)	281

In der folgenden Darstellung der Untersuchungsergebnisse entsprechen die genannten Zahlen, wenn nicht anders bezeichnet, der Anzahl der Fälle.

4.2 Analyse des Studienkollektivs bezüglich konventioneller klinischer und pathologischer Parameter

Alle Patientinnen wurden in den Jahren 1985 bis 2002 im Klinikum Großhadern operiert und postoperativ weiterbehandelt. Das verwendete Material stammte überwiegend aus den Jahren 1997 bis 2000. Diese Fälle entsprachen allen Fällen von ovariellen Karzinomen, die in diesem Zeitraum dem Tumorregister München gemeldet wurden. Ergänzend wurden Fälle aus einem institutsintern geführten Register von Ovarialtumoren hinzugefügt.

4.2.1 Ovarialkarzinome

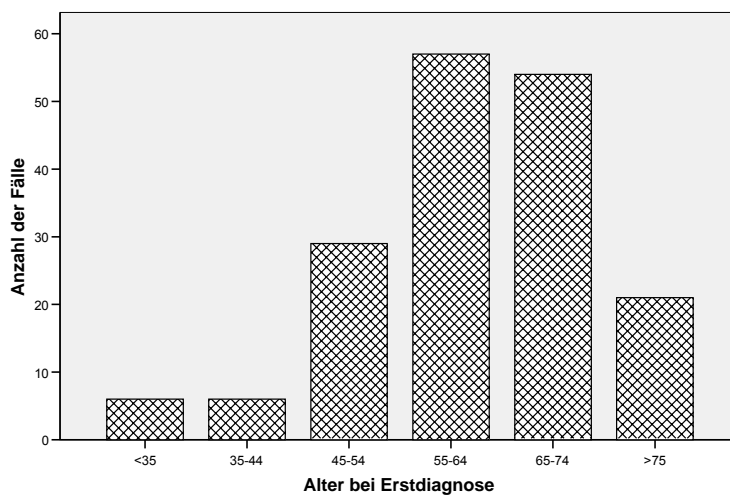
Im Kollektiv befanden sich 173 Karzinome verschiedener Differenzierungen, Grade und Stadien.

In diesem Kollektiv lag bei serösen Karzinomen häufiger ein fortgeschrittenes Stadium (75%) vor als bei muzinösen und endometrioiden ($p < 0,005$). Eine ähnliche Beziehung ergab sich in Hinblick auf das histopathologische Kerngrading. Seröse Karzinome waren häufiger gering differenziert, im Vergleich zu muzinösen und endometrioiden Karzinomen, die häufiger einer hohen Differenzierung aufwiesen ($p < 0,005$).

Tabelle 7: Kollektiv der Karzinome aufgeschlüsselt nach Histologie, Kerngrad und Stadium.

173 Karzinome, davon					
histologische Differenzierung davon:		136 Seröse Ca (78,6%)	12 muzinöse Ca (6,9%)	20 endometr. Ca (11,6%)	5 klarzellige Ca (2,9%)
G1	25 (14,5%)	12 (8,8%)	8 (66,7%)	5 (25%)	0
G2	68 (39,3%)	51 (37,5%)	3 (25%)	13 (65%)	1 (20%)
G3	80 (49,9%)	73 (53,7%)	1 (8,3%)	2 (10%)	4 (80%)
FIGO I	30 (18,7%)	9 (6,6%)	8 (66,7%)	9 (45%)	4 (80%)
FIGO II	12 (7,5%)	11 (8,1%)	0	1 (5%)	0
FIGO III	108 (62,4%)	97 (71,3%)	3 (25%)	8 (40%)	0
FIGO IV	6 (3,5%)	5 (3,7%)	0	0	1 (10%)
Fehlende Information zum FIGO Stadium von:	17 (9,8%)	14 (10,3%)	1 (8,3%)	2 (10%)	0

Die Fallzahl der klarzelligen Karzinome war zu gering für eine statistische Aussage. Zu 17 Fällen waren keine Informationen zum FIGO-Stadium im Befund vermerkt und konnten mit den erhaltenen Daten nicht ausreichend beurteilt werden. In Bezug auf das Alter der Erstdiagnose zeigte kein histologischer Tumortyp eine statistisch relevante Häufung. Die Verteilung der Tumorstadien und des Tumorgrades war bezüglich des Diagnosealters wie erwartet ($p=0,313$ bzw. $p=0,739$).

**Abbildung 6:** Alter bei Erstdiagnose der Gruppe der ovariellen Karzinome

In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose und der Dauer des Überlebens. Auch der histologische Tumortyp zeigte keine Beziehung zum Patientenüberleben ($p=0,6401$).

Tabelle 8: Überlebensdaten der Karzinome des Gesamtkollektivs, bezogen auf die histologische Differenzierung

Histologische Differenzierung	Überlebensdaten			
	tumorabhängig verstorben	tumorunabhängig verstorben	nicht beurteilbar	überlebt
Seröse Ca	34	1	43	57
Muzinöse Ca	2	1	5	4
Endomet.Ca	3	0	6	11
Klarzellige Ca	1	0	1	3
Gesamt	40	2	55	75

Der Vergleich von Tumorkerngrading und Tumorstadium zeigte eine deutliche statistische Signifikanz ($p<0,0005$), wobei hohe Differenzierung (G1) mit den niedrigen Tumorstadien (FIGO I und II) und umgekehrt korrelierte.

Tabelle 9: Gesamtkollektiv Verteilung der Tumorstadien auf das Tumorgrading

FIGO-Stadium	Anzahl der Fälle	Kerngrading		
		1	2	3
I	30	13 (43,3%)	11 (36,7%)	6 (20%)
II	12	0	6 (50%)	6 (50%)
III	108	9 (8,3%)	41 (38%)	58 (53,7%)
IV	6	0	2 (33%)	4 (67%)
gesamt	156	22 (14,1%)	60 (38,5%)	74 (47,5%)

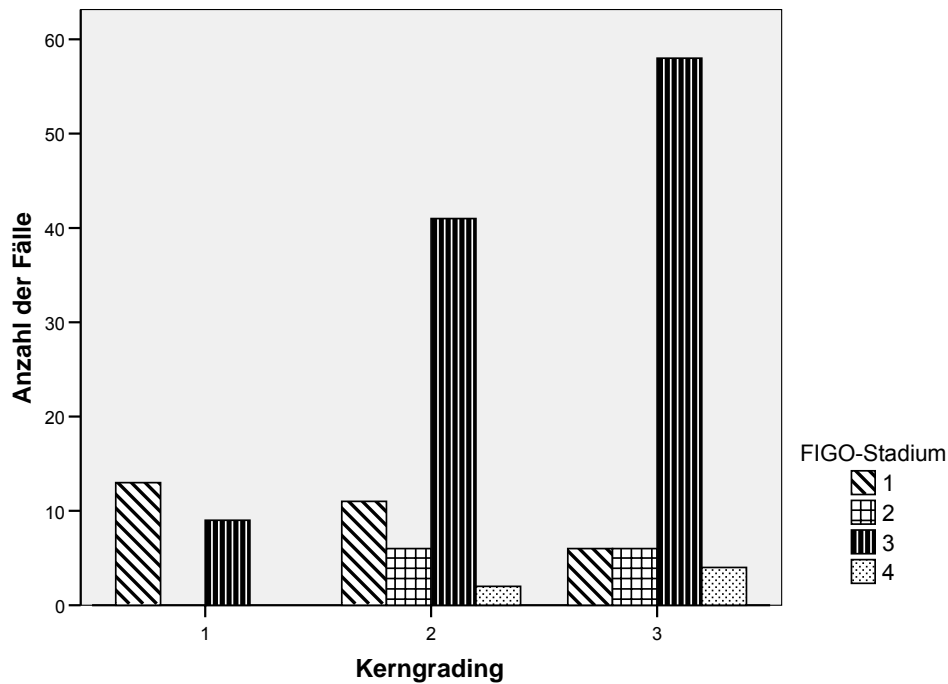


Abbildung 7: Tumorkerngrading der Ovarialkarzinome Kollektivs bezogen auf die FIGO-Stadien

Die Korrelation zwischen Überleben und Tumorgrading zeigte einen Trend, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,058$) (vgl. Abb. 8). Demnach war ein höhere Kerngrad (G2/G3) tendentiell mit einem kürzeren Überleben assoziiert.

Tabelle 10: Überlebensdaten bezogen auf den Tumorkerngrad

Grading	Überlebensdaten			
	tumorabhängig verstorben	tumorunabhängig verstorben	nicht beurteilbar	Überlebt
G1	4	1	9	11
G2	14	0	21	32
G3	22	1	25	32
Gesamt	40	2	55	75

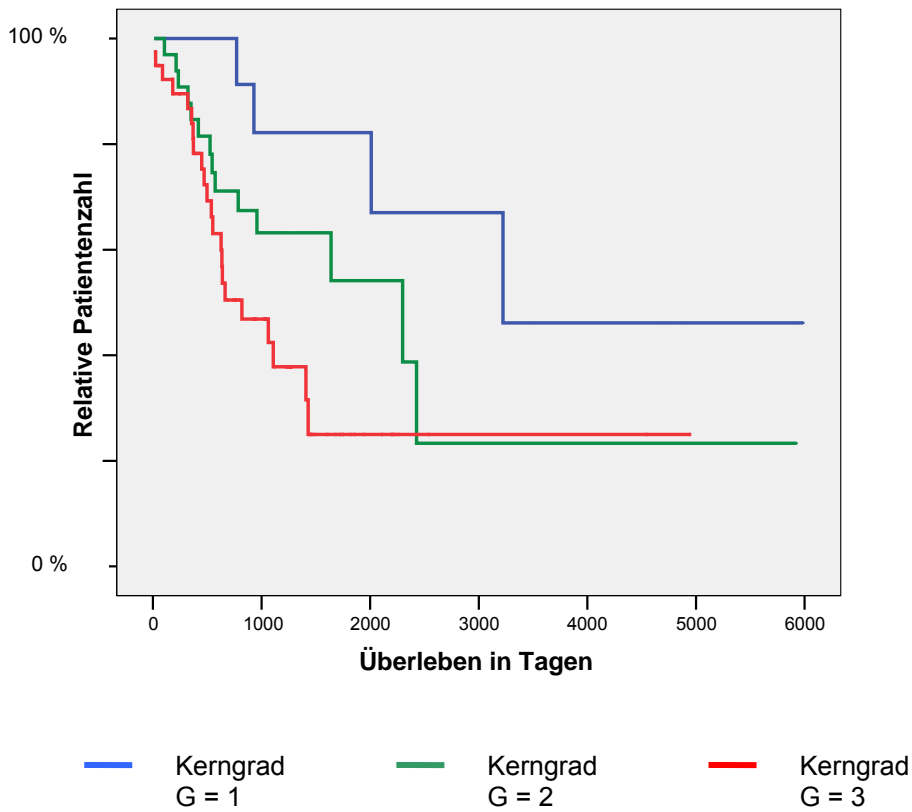


Abbildung 8: Überlebensanalyse bezogen auf das Tumorgrading

Im Gegensatz zum Kerngrading korrelierte das Tumorstadium eindeutig mit dem Überleben ($p=0,0314$). Die schlechtere Prognose der Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumorstadien wurde noch deutlicher, wenn man die frühen Tumorstadien (FIGO I und II) und die hohen Tumorstadien (FIGO III und IV) zusammenfasste ($\log \text{rank}=0,0041$) (vgl. Abb. 9).

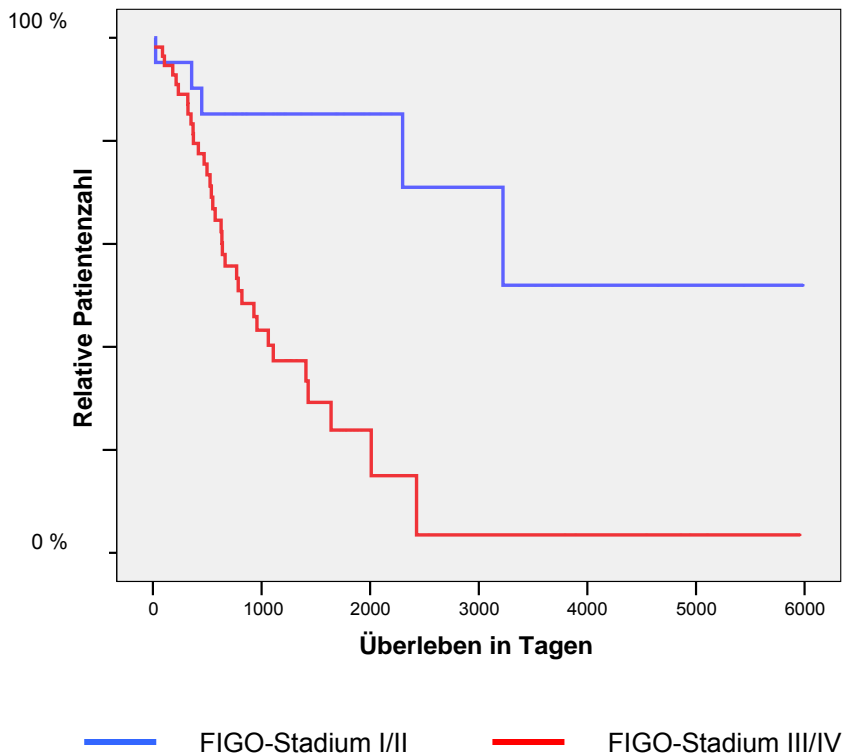


Abbildung 9: Überlebenskurve in Abhängigkeit vom Tumorstadium gruppiert FIGO I+II und FIGO III+IV

4.2.2 Borderline Tumoren

Diese Untergruppe umfasste 36 Tumoren verschiedener histologischer Differenzierungen, darunter 19 seröse, 16 muzinöse und ein endometrioider Tumor. Die einzelnen histologischen Tumortypen zeigten keine Unterschiede in Bezug auf das Manifestationsalter. Überlebensdaten standen zu 100% zur Verfügung. Vier Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung unabhängig von ihrem Tumorleiden verstorben. Die übrigen 32 Patienten lebten. Eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier erübrigte sich somit.

4.2.3 Granulosazelltumoren

Diese Untergruppe umfasste 20 Tumoren. Das Alter der Patientinnen bei Diagnose lag zwischen 6 und 78 Jahren.

Überlebensdaten waren zu 17 Fällen vorhanden. Dabei waren drei Patientinnen an ihrem Tumorleiden verstorben, die Umstände dreier weiterer Todesfälle waren nicht beurteilbar, elf Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen am Leben. In der statistischen Auswertung fand sich keine Korrelation zwischen dem Alter bei

Erstmanifestation und dem Überleben. Das Tumorstadium zeigte einen deutlichen Zusammenhang mit dem Überleben. Die drei am Tumorleiden verstorbenen Patientinnen waren jeweils in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III) gewesen. Das Tumorstadium wies somit prognostische Signifikanz auf.

4.2.4 Maligne Müller`sche Mischtumoren

Diese Untergruppe wurde von 14 Karzinosarkomen gebildet. Diese invasiv wachsenden Tumoren weisen charakteristischerweise Anteile mesenchymaler Differenzierung neben Arealen epithelialer Differenzierung auf. In dieser Studie wurde die intratumorale Heterogenität berücksichtigt, indem die Bezirke unterschiedlicher Differenzierung in verschiedenen Stenzen erfasst wurden. Das Alter der Patientinnen lag bei Diagnosestellung zwischen 28 und 91 Jahren, wobei 12 von 14 Patientinnen über 62 Jahre alt waren.

Zum Zeitpunkt der Studie waren fünf Patientinnen an ihrem Tumorleiden verstorben. Bei weiteren fünf Patientinnen blieb die Todesursache laut Tumorregister unklar. Die übrigen vier Patientinnen überlebten. Es fand sich kein statistischer Zusammenhang zwischen sowohl dem Manifestationsalter wie auch dem Tumorstadium und dem Überleben. Jedoch kann dies auch durch die geringe Probenanzahl begründet sein.

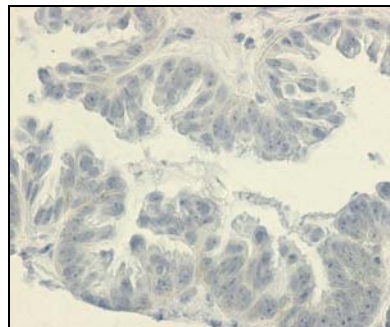
4.2.5 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitale

Es handelte sich hierbei um drei Tubenkarzinome, ein Dysgerminom, ein Teratom, einen neuroendokrinen Tumor, ein Leiomyosarkom des Ovars und ein Fibrosarkom des Ovars. Diese Fälle stellten repräsentativ eine kleine Gruppe seltener ovarialer Neoplasien dar. Zwei der Patientinnen mit Karzinomen der Tube waren an ihrem Leiden verstorben. Unter nicht näher bekannten Umständen waren die Patientinnen mit Leiomyosarkom, Tubenkarzinom und neuroendokrinem Karzinom verstorben. Die übrigen drei Patientinnen dieser heterogenen Gruppe waren zum Zeitpunkt der Studie am Leben. Die geringe Fallzahl der einzelnen Entitäten ließ keine weitergehende statistische Auswertung zu.

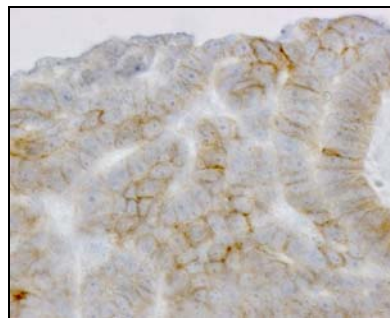
4.3 Immunhistochemische Untersuchung des Her-2/*neu* Rezeptors mit dem HercepTest®

Der HercepTest® (DAKO) stellt ein immunhistochemisches Verfahren dar. Dabei werden mittels polyklonaler Antikörper Anteile der extrazellulären Domäne des Her-2/*neu* Rezeptors markiert. Durch eine enzymatisch vermittelte Reaktion der gebundenen Antikörper wird die Zielstruktur sichtbar und kann semiquantitativ ausgewertet werden.

Score 0/1+



Score 2+



Score 3+

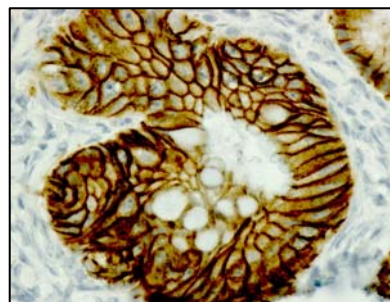


Abbildung 10: Darstellung der unterschiedlichen Färbintensitäten des HercepTest®

Im HercepTest® konnten 5,7% (15/262) der Fälle aufgrund des Verlustes von Stanzmaterial nicht beurteilt werden. In der folgenden Übersichtstabelle werden die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 11: Ergebnisse des HercepTests® im Gesamtkollektiv

Tumortyp	Anzahl der Fälle	HercepTest®			
		0	1+	2+	3+
Karzinome	163	134 (82,2%)	18 (11%)	6 (3,7%)	5 (3,1%)
Borderline-Tumoren	36	28 (77,8%)	7 (19,4%)	0	1 (2,8%)
Granulosa-zelltumoren	20	20 (100%)	0	0	0
benigne Tumoren	6	6 (100%)	0	0	0
Müller`sche-Mischtumoren	13	5 (38,4%)	3 (23,1%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)
andere Karzinome	8	8 (100%)	0	0	0
Gesamt	246	201 (81,8%)	28 (11,3%)	10 (4%)	7 (2,8%)

In der statistischen Auswertung des Hercep®Tests wurden die Ergebnisse HCT=0 und HCT=1+ als negativ zusammengefasst. HCT=2+ und HCT=3+ wurden sowohl getrennt, wie auch gemeinsam dieser Gruppe gegenübergestellt. Bei der jeweiligen Auswertung wird auf diesen Punkt speziell hingewiesen. Dieses Vorgehen rechtfertigt sich dadurch, daß die Gruppe der HCT=2+ in Bezug auf die zugrunde liegenden Genveränderungen heterogen ist und dies in der Auswertung und insbesondere bei Vergleich der beiden Untersuchungstechniken berücksichtigt werden muss (Näheres in der Diskussion).

Im Folgenden wurden zunächst die einzelnen Typen von Ovarialkarzinomen getrennt voneinander ausgewertet.

4.3.1 Ovarialkarzinome

In der immunhistochemischen Untersuchung waren 94,2% (163 von 173 Fällen) der Karzinome auswertbar.

Tabelle 12: Histologischer Typ und HCT-Werte der Karzinome

Histologische Differenzierung		HercepTest®			
		0	1+	2+	3+
163 Karzinome:		134 (82,2%)	18 (11,0%)	6 (3,7%)	5 (3,1%)
126 seröse Karzinome:		105 (83,3%)	15 (11,9%)	4 (3,2%)	2 (1,6%)
G1	10	9 (90%)	1 (10%)	0	0
G2	43	37 (86,0%)	5 (11,6%)	1 (2,3%)	0
G3	73	59 (80,8%)	9 (12,3%)	3 (4,1%)	2 (2,7%)
12 muzinöse Karzinome:		9 (75%)	1 (8,3%)	0	2 (16,7%)
G1	8	6 (75%)	1 (12,5%)	0	1 (12,5%)
G2	3	2 (66,7%)	0	0	1 (33,3%)
G3	1	1 (100%)	0	0	0
20 endometrioid Karzinome:		17 (85,0%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
G1	5	5 (100%)	0	0	0
G2	13	10 (76,9%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)
G3	2	2 (100%)	0	0	0
5 klarzellige Karzinome:		3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0
G1	0	0	0	0	0
G2	1	0	0	1 (100%)	0
G3	4	3 (75%)	1 (25%)	0	0

Unter Berücksichtigung der histologischen Subtypen und des Tumorgradings ergaben sich HercepTest®-Werte wie in Tabelle 12 und 13 aufgeführt. Es fand sich keine Korrelation zwischen dem histologischen Typ des Karzinoms, (also serös muzinös, endometrioid oder klarzellig) und dem Grad der Proteinexpression ($p=0,222$), wenn HCT 0/1+ mit HCT=2+/3+ verglichen wurde. Vergleich man die

HCT=0/1+ mit HCT=2+ und HCT=3+ getrennt, so wies die Gruppe der serösen Karzinome signifikant mehr HCT=3+ und weniger 0/1+ auf, als die übrigen histologischen Gruppen ($p=0,042$). Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem Tumorkerngrading und den einzelnen histologischen Gruppen (p zwischen 0,414 und 0,638). Vergleich man das Tumorkerngrading der gesamten Karzinomgruppe mit dem Grad an Proteinexpression (vgl. Tab. 13), ergab sich auch hier keinerlei Abhängigkeit ($p=0,786$) (HCT=0/1+ vs HCT=2+/3+).

Auch nach Umgruppierung HercepTest® Ergebnisse änderte sich nichts an diesem Ergebnis (HCT=0/1+ vs HCT= 2+ vs HCT=3+ bzw. HCT=0 vs. HCT=1+/2+/3+).

Tabelle 13: Proteinexpression bezogen auf das Tumorkerngrading des Gesamtkollektivs

Grading	Gesamt	HercepTest®			
		0	1+	2+	3+
G1	23	20 (87%)	2 (8,7%)	0	1 (4,3%)
G2	60	49 (81,7%)	6 (10%)	3 (5%)	2 (3,3%)
G3	80	65 (81,2%)	10 (12,5%)	3 (3,8%)	2 (2,5%)
Gesamt	163	134 (82,2%)	18 (11,0%)	6 (3,7%)	5 (3,1%)

Von den 156 FIGO-klassifizierten Karzinomen konnte in 147 Fällen (94,2%) der HercepTest® ausgewertet werden (vgl. Tab. 14). Das Tumorstadium nach FIGO zeigte dabei keine Korrelation zur Intensität der Proteinexpression ($p=0,257$). Auch nach Zusammenfassung von Tumorstadien konnte kein Einfluss bzw. Zusammenhang zwischen frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO I und III vs FIGO III und IV) und den Ergebnissen des HercepTest® gezeigt werden (HCT=0/1+ vs HCT= 2+ vs HCT=3+ bzw. HCT=0 vs. HCT=1+/2+/3+).

Tabelle 14: HCT-Werte bezogen auf das FIGO-Stadium

Tumor-Stadium	Gesamt	HercepTest®			
		0	1+	2+	3+
FIGO I	30	24 (80%)	2 (6,6%)	2 (6,6%)	2 (6,6%)
FIGO II	11	10 (90,1%)	1 (9,9%)	0	0
FIGO III	100	82 (82%)	13 (13%)	2 (2%)	3 (3%)
FIGO IV	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0	0
Gesamt	147	121 (82,3%)	17 (11,6%)	4 (2,7%)	5 (3,4%)

Bei 37 der 40 am Tumorleiden verstorbenen Patientinnen konnte der Hercep-Test® ausgewertet werden. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab sich hierbei kein Einfluss des Status der Proteinexpression auf die Überlebensdauer ($p=0,6932$).

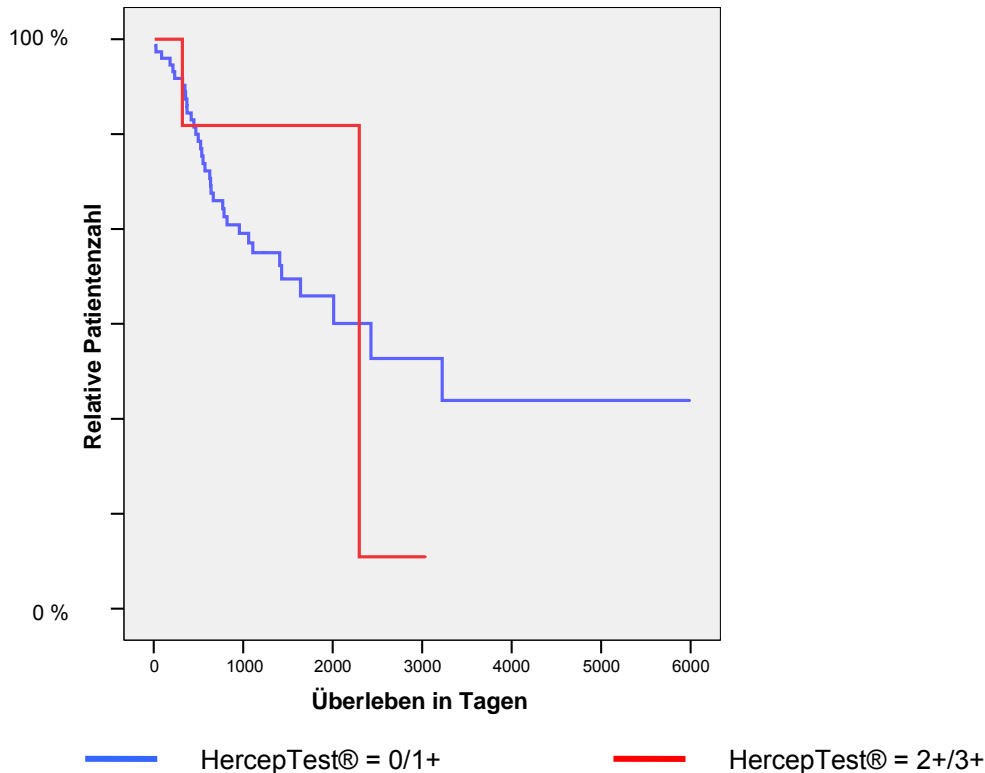


Abbildung 11: Überlebensanalyse in Abhängigkeit von der HCT-Proteinexpression

4.3.2 Borderline Tumoren

Alle Borderline Tumoren (100%) waren immunhistochemisch auswertbar. Der histologische Tumortyp korrelierten nicht mit der Proteinexpression ($p=0,526$ für HCT=0/1+ vs HCT 2+/3+).

Tabelle 15: Histologische Differenzierung und HCT-Werte

Histologische Differenzierung	Anzahl der Fälle	HercepTest®			
		0	1+	2+	3+
Serös	19	18 (94,7%)	1 (5,3%)	0	0
Muzinös	16	9 (56,3%)	6 (37,5%)	0	1 (6,2%)
Endometrioid	1	1 (100%)	0	0	0
Gesamt	36	28 (77,8%)	7 (19,4%)	0	1 (2,8%)

Unterstellt man eine Rezeptorüberexpression bereits bei HCT=1+, rechnete also HCT=0 vs HCT=1+/2+/3+, so zeigten die muzinösen Borderline-Tumoren signifikant häufiger positive Ergebnisse als die serösen Tumoren (p=0,021). Da keine Patientin an ihrem Tumorleiden verstarb, war eine Überlebensanalyse nicht sinnvoll.

4.3.3 Granulosazelltumoren

Alle 20 Fälle (=100%) der Granulosazelltumoren waren immunhistochemisch auswertbar. Alle untersuchten Fälle wiesen den HercepTest®-Score 0 auf. Somit erübrigte sich eine weitere statistische Auswertung.

4.3.4 Benigne Zystadenome

In der kleinen Gruppe der benignen Tumoren lag die Auswertbarkeit bei 54,5% (6 von 11) Fällen. Wobei die Auswertbarkeit sich ausschließlich durch das Fehlen von Tumormaterial limitierte. Alle Tumoren wiesen einen HercepTest®-Score von 0 auf.

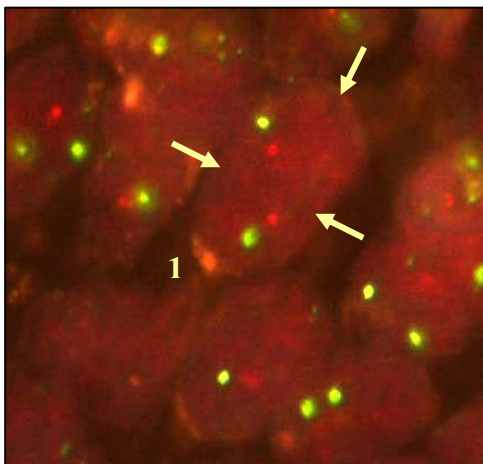
4.3.5 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitales

Alle acht Tumoren (=100%) dieser Gruppe konnten im immunhistochemischen HercepTest® ausgewertet werden. Alle Fälle zeigten keinerlei membranale Signalanreicherung in der Untersuchung und erhielten den HercepTest®-Score 0. Weitere Auswertungen wurden daher nicht vorgenommen.

Die Ergebnisse der malignen Müller'schen Mischtumoren werden am Ende des folgenden Kapitels gemeinsam mit den dazugehörigen FISH-Ergebnissen vorgestellt.

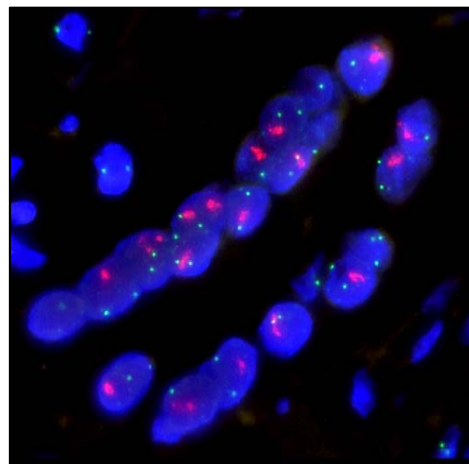
4.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Her-2/*neu* Gens

Unter Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung versteht man den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen in Zell- oder Schnittpräparaten unter zu Hilfenahme verschiedenfarbiger Fluorochrome. Diese Technik kann auch noch an über 15 Jahre altem, in Paraffin eingebettetem Material durchgeführt werden und eignet sich daher besonders für retrospektive Studien. Durch ausgewählte DNA-Sonden wird das zu untersuchende Gen mit einer bestimmten Fluoreszenz-Farbe markiert und die so generierten Signale unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. In Kombination mit einer weiteren Sonde, welche das Zentromer des Chromosoms, auf dem das Gen liegt, mit einer anderen Fluoreszenz-Farbe anfärbt, erhält man zusätzlich Informationen über das Verhältnis von Chromosomenzahl zu Genzahl. Dies erlaubt die Unterscheidung von einer Polysomie und einer tatsächlichen Amplifikation des Gens.



Normaler Gensatz / keine Amplifikation:

Der Tumorzellkern im Zentrum (Pfeile) enthält zwei grüne Zentromer- und zwei rote Gensignale (sowie ein rötlich-oranges Artefakt (1)).



Hohe Amplifikation:

Die Tumorzellkerne enthalten jeweils zwei grüne Zentromersignale sowie ein Cluster aus zahlreichen kleinen roten Gensignalen.

Abbildung 12: Fluoreszenz-Aufnahme nicht amplifizierter Kerne und von Kernen mit Genclustern

Die Untersuchungen wurden mit dem PathVysion-System (Vysis/Abbott) durchgeführt. Hierbei entspricht das grüne Signal der Zentromerregion des Chromosoms 17, das rote Signal dem spezifischen Her-2/*neu*-Locus auf dem langen Arm des Chromosoms 17.

4.4.1 Allgemeine Auswertbarkeit

In der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung waren 83,6% der Fälle (219 von 262) auswertbar.

Tabelle 16: Ergebnisse der FISH-Untersuchung im Gesamtkollektiv

Histologische Differenzierung	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Andere Ergebnisse
Karzinome	146	112 (76,7%)	4 (2,7%)	6 (4,1%)	24 (16,4%)
Borderline Tumoren	31	27 (87,1%)	0	1 (3,2%)	3 (9,6%)
Granulosazelltumoren	18	18 (100%)	0	0	0
Benigne Tumoren	3	3 (100%)	0	0	0
Müller'sche Mischtumoren	13	2 (15,6%)	0	1 (7,7%)	10 (77%)
Andere Tumoren	8	6 (75%)	0	0	2 (25%)
Gesamt	219	167 (76,2%)	5 (2,3%)	8 (3,7%)	39 (17,8%)

Der Sammelbegriff „andere Ergebnisse“ umfasste Veränderungen, die nicht unter das Standardergebnis (nicht amplifiziert, schwach oder hoch amplifiziert) geführt werden sollten. Dazu zählten Monosomien, Deletionen, Trisomien und Polysomien.

Tabelle 17 : „andere Ergebnisse“ aus Tabelle 16 aufgeschlüsselt

Histologische Differenzierung	Anzahl der Fälle	FISH „andere Ergebnisse“			
		Monosomie	Deletion	Trisomie	Polysomie
Karzinome	24	9 (37,5%)	2 (8,3%)	5 (20,9%)	8 (33,3%)
Borderline-Tumoren	3	0	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)
Müller-Misch-Tumoren	10	0	0	1 (10%)	9 (90%)
Andere Tumoren	2	0	0	1 (50%)	1 (50%)

Zur Erleichterung der weiteren statistischen Aufarbeitung wurden diese Ergebnisse für die Gruppe der Ovarialkarzinome vereinfacht. So wurden Monosomien und Deletionen und Trisomien zu den nicht amplifizierten Fällen dazugezählt. Polysomien wurden speziell berücksichtigt. Dieses Vorgehen orientiert sich an den Vorgaben von Pauletti et al. (2001).

4.4.2 Ovarialkarzinome

In der FISH waren 84,4% (146 von 173) der Karzinome auswertbar.

Tabelle 18: Histologische Differenzierung, Grad und FISH Ergebnisse der ovariellen Karzinome

Histologische Differenzierung		FISH			
		Nicht Amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
146 Karzinome		127 (76%)	4 (3,4%)	6 (4,1%)	9 (16,4%)
111 Seröse Karzinome		98 (88,3%)	4 (3,6%)	3 (2,7%)	6 (5,4%)
G1	9	9 (100%)	0	0	0
G2	38	36 (94,7%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	0
G3	64	53 (82,8%)	3 (4,7%)	2 (3,1%)	6 (9,4%)
12 Muzinöse Karzinome		10 (83,3%)	0	2 (16,7%)	0
G1	8	7 (87,5%)	0	1 (12,5%)	0
G2	3	2 (66,7%)	0	1 (33,3%)	0
G3	1	1 (100%)	0	0	0
19 Endometrioid Karzinome		16 (84,2%)	0	1 (5,3%)	2 (10,5%)
G1	5	5 (100%)	0	0	0
G2	12	10 (83,3%)	0	1 (8,3%)	1 (8,3%)
G3	2	2 (100%)	0	0	0
4 Klarzellige Karzinome		3 (75%)	0	0	1 (25%)
G1	0	0	0	0	0
G2	1	0	0	0	1 (100%)
G3	3	3 (100%)	0	0	0

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der histologischen Differenzierung (serös, muzinös, endometrioid oder klarzellig) und dem Ergebnis der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (p zwischen 0,135 und 0,638). Die Fälle mit Her-2/*neu* Amplifikation verteilten sich auf die histologischen Untergruppen annähernd gleich. Im Rahmen der statistischen Analyse fand sich keine Korrelation zwischen Tumorgrading (G1-G3) und dem Genstatus in der FISH ($p=0,555$).

Tabelle 19: FISH-Untersuchung bezogen auf das Tumorgrading

Grading	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
G1	22	21 (95,5%)	0	1 (4,5%)	0
G2	54	48 (88,9%)	1 (1,8%)	3 (5,6%)	2 (3,7%)
G3	70	59 (84,3%)	3 (4,2%)	2 (2,9%)	6 (8,6%)
Gesamt	146	128 (87,7%)	4 (2,7%)	6 (4,1%)	8 (5,5%)

Für die statistische Auswertung der Daten zum Tumorstadium und einer möglichen Beziehung zu den Untersuchungsergebnissen der FISH standen von 75,1% der Karzinomfälle (130 von 173) sowohl FIGO-Daten als auch FISH-Ergebnisse zur Verfügung. Es fand sich keine signifikante Häufung von Fällen mit Her-2/*neu* Amplifikation in einer der Gruppen ($p=0,104$).

Tabelle 20: Stadienverteilung und FISH Ergebnisse der Karzinome

FIGO-Stadium	Gesamt	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
I	28	24 (85,7%)	0	3 (10,7%)	1 (3,6%)
II	8	8 (100%)	0	0	0
III	90	78 (86,7%)	2 (2,2%)	3 (3,3%)	7 (7,8%)
IV	4	3 (75%)	1 (25%)	0	0
Gesamt	130	100 (76,9%)	3 (2,3%)	6 (4,6%)	21 (16,2%)

In dieser Gruppe waren 33 Patientinnen, für die FISH Daten vorlagen, an ihrem Tumorleiden verstorben. In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ergab sich für diese Fälle kein Zusammenhang zwischen den FISH-Ergebnissen und der Überlebensdauer ($p=0,96$).

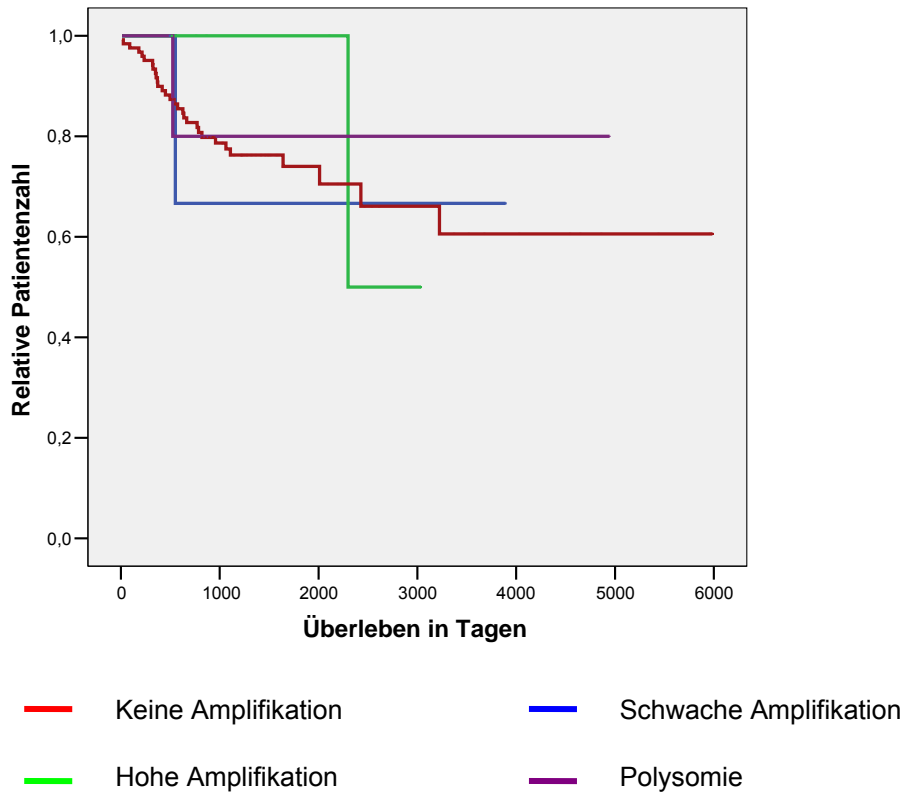


Abbildung 3: Überlebensanalyse in Abhängigkeit von der FISH

4.4.3 Borderline-Tumoren

In der FISH-Untersuchung waren 86,1% der Borderline-Tumoren (31 von 36 Fällen) auswertbar. Es ergab sich keine statistische signifikante Korrelation zwischen den histologischen Tumortypen und den Ergebnissen der FISH-Untersuchung (p=0,496).

Tabelle 21: Histologische Tumortypen bezogen auf die FISH

Histologische Differenzierung	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Gering amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
Serös	18	17 (100%)	0	0	0
Muzinös	12	10 (83,4%)	0	1 (8,3%)	1 (8,3%)
Endometrioid	1	1 (100%)	0	0	0
Gesamt	31	29 (93,6%)	0	1 (3,2%)	1 (3,2%)

4.4.4 Karzinome und Borderline-Tumoren

Fasste man die Gruppe der Karzinome und der Borderline-Tumoren zusammen und analysierte alle Fälle entsprechend dem histologischen Typ, ergab sich eine statistisch signifikante Häufung. Tumoren muzinöser Differenzierung zeigten eine höhere Rate an HercepScore=3+ in der Immunhistologie, während seröse Tumoren häufiger negative HercepTest®-Ergebnisse hatten ($p = 0,039$).

Tabelle 22: Verteilung der HercepTest®-Werte von Karzinomen und Borderline-Tumoren nach dem histologischen Typ

Morphologie	Anzahl der Fälle	HercepTest®		
		0 / 1+	2+	3+
Serös	145	139 (95,8%)	4 (2,8%)	2 (1,4%)
Muzinös	28	25 (89,3%)	0	3 (10,7%)
Endometrioid	21	19 (90,6%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)
Klarzellig	5	4 (80%)	1 (20%)	0
Gesamt	199	187 (94%)	6 (3%)	6 (3%)

Bei gleicher Gruppeneinteilung und Korrelation mit den Resultaten der FISH konnte dieses Ergebnis auf der Ebene der Genveränderungen nicht bestätigt werden ($p = 0,319$).

Tabelle 23: Verteilung der FISH-Werte von Karzinomen und Borderline-Tumoren nach der histopathologischen Morphologie

histologische Differenzierung	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
Serös	129	116 (89,9%)	4 (3,1%)	3 (2,3%)	6 (4,7%)
Muzinös	24	20 (83,3%)	0	3 (12,5%)	1 (4,2%)
Endometrioid	20	18 (90%)	0	1 (5%)	1 (5%)
Klarzellig	4	3 (75%)	0	0	1 (25%)
Gesamt	177	157 (88,7%)	4 (2,3%)	7 (4,0%)	9 (5%)

Auch bei unterschiedlicher Definition der Gruppe mit Genamplifikation (Polysomie als nicht amplifiziert oder als amplifiziert gewertet) konnte das Ergebnis der Immunhistologie nicht auf die FISH-Untersuchung übertragen werden.

4.4.5 Granulosazelltumoren

90% der Granulosazelltumoren (18 von 20) waren in der FISH auswertbar. Kein Tumor wies eine genetische Veränderung im *Her-2/neu* Gen auf. Weitere Analysen erübrigten sich somit.

4.4.6 Benigne Zystadenome

3 von 11 Fällen (27%) waren in der FISH auswertbar. Keiner von ihnen wies eine Veränderung des *Her-2/neu* Gens auf. Die mangelnde Auswertbarkeit kam durch die geringe Anzahl erhaltener Stanzenzustände (6/11). Zusätzlich war nur selten eine ausreichende Anzahl an Kernen vorhanden. Daher erfolgten keine weiteren statistischen Analysen.

4.4.7 Andere Tumoren des weiblichen inneren Genitales

Alle Tumoren (8/8) waren in der FISH auswertbar. Alle acht Tumoren zeigten keine Auffälligkeiten in der FISH-Untersuchung.

4.4.8 Maligne Müller`sche Mischtumoren

Die Gruppe der Müller`schen Mischtumoren stellt ein außerordentlich heterogenes Kollektiv dar. Die Tumoren waren jeweils durch insgesamt 6 Stenzen auf dem Block vertreten. Dieses Vorgehen war aufgrund ihrer morphologischen Heterogenität gewählt worden. Es bestand dabei die Erwartung, dass sich dieses histopathologische Phänomen auch auf genetischer Ebene zeigen könnte. Die Auswertung stellte sich als problematisch heraus.

Ein Fall war nicht vorhanden bzw. nicht auswertbar. Es wurden mindestens 3 und maximal 6 Stenzen ausgewertet. Waren drei auswertbar, so wurden keine weiteren gezählt.

In der Immunhistochemie zeigten sieben Fälle ausschließlich negative Ergebnisse (0/1+) (Fall Nr. 950, 951, 953, 954, 957, 960, 961, 963). Weitere vier Fälle wiesen in mindestens einer Stanze einen moderat positiven (2+) Test auf (Fall Nr. 952, 958, 959, 962). Nur ein Fall zeigte in zwei Stenzen eine starke Her-2/*neu* Expression (3+).

In der FISH zeigten vier Fälle eine Polysomie in allen gewerteten Stenzen (Fall Nr. 951, 952, 959, 960). Sechs weitere Fälle zeigten in mindestens einer der gewerteten Stenzen einen polysomen Genstatus (Fall Nr. 950, 953, 954, 958, 961, 963). Zwei Fälle zeigten eine stärker gradige Veränderung mit einer schwachen oder hohen Amplifikation (Fall Nr. 955, 962). Eine eindeutige Zuordnung der Veränderungen zu einem bestimmten histopathologischen Differenzierungsmuster war nicht möglich.

Die Darstellung der Ergebnisse des HercepTest® und der FISH erfolgt zur besseren Übersicht gemeinsam.

Tabelle 24: HercepTest® und FISH Ergebnisse der malignen Müller'schen Mischtumoren

Interne Nummer	HercepTest®			FISH		
	Stanze 1	Stanze 2	Stanze 3	Stanze 1	Stanze 2	Stanze 3
950	0	0	0	1	1	4
951	0	0	1	4	4	4
952	1	1	2	4	4	4
953	0	0	0	4	1	1
954	1	1	0	1	1	4
955	3	3	1	4	2	4
956	-	-	-	-	-	-
957	0	0	0	-	1	1
958	2	0	2	4	1	6
959	2	0	0	4	-	4
960	0	0	0	4	4	4
961	-	1	0	1	4	1
962	2	1	0	3	1	4
963	0	0	0	1	1	4

Legende HercepTest®:

- = Stanze nicht vorhanden, 0 = keine Anreicherung, 1 = schwache Anreicherung

2 = Moderaten zirkuläre Anreicherung, 3 = starke zirkuläre Anreicherung

Legende FISH Ergebnisse:

- = Stanze nicht vorhanden oder nicht auswertbar, 1 = nicht amplifiziert,

2 = schwach amplifiziert, 3 = hoch amplifiziert, 4 = Polysomie, 6 = Trisomie

4.5 Gegenüberstellung von Immunhistochemie und FISH

217 von 262 Fälle (82,8%) konnten sowohl in der Immunhistochemie als auch in der FISH erfolgreich ausgewertet werden. Es ergab sich hierbei eine hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden ($p < 0,0005$).

Tabelle 25: HercepTest®- und FISH-Werte im Vergleich an den Fällen

Hercep Test®	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
0	174	165 (94,8%)	1 (0,6%)	0	8 (4,6%)
1+	26	18 (69,2%)	1 (3,8%)	0	7 (27%)
2+	10	2 (20%)	2 (20%)	3 (30%)	3 (30%)
3+	7	1 (14,3%)	0	5 (71,4%)	1 (14,3%)
gesamt	217	186 (85,6%)	4 (1,8%)	8 (3,7%)	19 (8,7%)

Um beide Untersuchungen zu vergleichen wurden zusätzlich alle Stanzzyylinder einzeln gewertet. Hierdurch erhöhte sich die Zahl an auswertbaren Daten. 247 von 301 Stanzen (82,1%) waren sowohl in der Immunhistochemie, wie auch in der FISH auswertbar.

Tabelle 26: Vergleich von HercepTest®- und FISH-Werte an den Stanzen

Hercep-Test®	Anzahl der Fälle	FISH			
		Nicht amplifiziert	Schwach amplifiziert	Hoch amplifiziert	Polysomie
0	195	179 (91,8%)	1 (0,5%)	0	15 (7,7%)
1+	31	20 (64,5%)	1 (3,2%)	0	10 (32,3%)
2+	11	2 (18,2%)	2 (18,2%)	3 (27,2%)	4 (36,4%)
3+	10	1 (10%)	1 (10%)	6 (60%)	2 (20%)
gesamt	247	202 (81,8%)	5 (2%)	9 (3,6%)	31 (12,6%)

Alle 9 Gewebszylinder mit Nachweis einer hochgradigen Amplifikation in der FISH wurden in der Immunhistochemie mit einem Hercep-Score von 2+ oder 3+ bewertet. 6 von diesen 9 Stenzen (66,7%) erhielten im HercepTest® einen 3+ Score, die restlichen 3 Stenzen eine Score von 2+. 3 Stenzen erhielten den Hercep-Score 3+, 6 Stenzen einen Score von 2+ ohne ein entsprechendes Korrelat im Sinne einer Genamplifikation in der FISH aufzuweisen. 6 dieser 9 Stenzen (66,7%) wiesen allerdings eine Veränderung im Sinne einer Polysomie in der FISH auf. 3 Stenzen zeigten trotz einer hohen Proteinexpression im HercepTest® keine Zunahme an Genkopien.

Die Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden war in der statistischen Auswertung hoch signifikant ($p < 0,0005$).

5. Diskussion

5.1 Bedeutung von Her-2/*neu* Gen- und Rezeptorveränderungen

5.1.1 Ovarialkarzinome

Die meisten malignen Tumoren des Menschen weisen charakteristische Veränderungen auf genetischer und molekularer Ebene auf. Bei jeder Neubeschreibung genetischer Aberrationen stellt sich die Frage, ob und welchen Einfluss diese Gen- bzw. Proteinveränderungen auf die verschiedenen tumorbiologischen Aspekte wie z.B. das autonome Wachstumsverhalten, die histopathologische Differenzierung und den Malignitätsgrad sowie das klinische Verhalten, erkennbar an der Rezidivrate und dem Überleben, haben. So zielen anschließende Untersuchungen u.a. darauf ab, mögliche prognostische Marker zu etablieren, neue diagnostische Marker zu finden und eventuell einen therapeutischen Ansatz zu entwickeln. Paradigmatisch wurde dies in den letzten Jahren am Beispiel des Her-2/*neu* Gens beim Mammakarzinom gezeigt. Zunächst wurde eine Assoziation einer Her-2/*neu* Genvermehrung mit einer reduzierten Prognose betroffener Patientinnen gefunden (u.a. Slamon et al., 1989). Die Forschungen führten zur Entwicklung von Herceptin®, einem Antikörper, der in der Lage ist, die stimulierende Funktion des Her-2/*neu* auf die Tumorzelle zu unterbrechen und die Prognose der Patientinnen zu verbessern (u.a. Slamon et al., 2001).

Aufgrund der gut belegten Bedeutung von Her-2/*neu* für das Mammakarzinom liegt es nahe, weitere epitheliale Tumoren bezüglich dieser Veränderung zu untersuchen. Besonders bei Karzinomen mit schlechter Prognose drängt sich diese Frage wegen der möglichen Therapieoption mit dem Herceptin® Antikörper auf.

Beim Ovarialkarzinom ist neben einer Vielzahl von anderen Genveränderungen (Sharp et al., 1997) auch eine Amplifikation des Her-2/*neu* Gens bereits mehrfach beschrieben worden (Slamon et al., 1989; Berchuk et al., 1990; Press et al., 1990; Rubin et al., 1992 und 1994; Makar et al., 1994; Fajac et al., 1995; Medl et al., 1995; Afify et al., 1999; Skirnisdottir et al., 2001; Hellström et al., 2001; Høgdall et al., 2003; Verri et al., 2005), jedoch ist die Datenlage nach wie vor kontrovers.

Eine Analyse des Her-2/*neu* Gens bei Ovarialkarzinomen war auch Gegenstand dieser Arbeit. Es ist bekannt, dass eine normale Zelle mit einem diploiden

Chromosomensatz im Zellkern zwei Kopien dieses Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 17 besitzt. In diesem Zustand sind in der Zellmembran 20-50 000 Her-2/*neu* Rezeptoren eingebaut. Bei Verdrei- oder Vervielfachung des Gens erhöht sich diese Rezeptorzahl auf über eine Million (Benz et al., 1992). Da es sich dabei um den Rezeptor eines Wachstumsfaktors handelt, führt dies zu einer vermehrten Wachstumsstimulation der Zelle. Die Her-2/*neu* Amplifikation kann aufgrund des aggressiveren Tumorwachstums für die Patienten mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein und daher eine Zielgruppe für eine intensivere adjuvante Therapie definieren. Dieses ist für Mammakarzinome mit Her-2/*neu* Amplifikation in diversen Studien bestätigt worden (Slamon et al., 1989; Seshadri et al., 1993). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Her-2/*neu* überexprimierenden Tumorzellen eine veränderte (herabgesetzte) Chemosensitivität gegenüber Standardchemotherapeutika aufweisen. Dieser Effekt manifestiert sich vor allem in Bezug auf Substanzen, die einen Schaden an der DNA induzieren. Beispiel hierfür ist die Stoffgruppe der Alkylantien. Von besonderem Interesse sind platinhaltige Therapeutika, die in der systemischen Therapie des Ovarialkarzinoms eingesetzt werden. Ursache für diese Resistenz könnte die verbesserte Fähigkeit der Her-2/*neu* überexprimierenden Tumorzelle sein, DNA-Schäden zu reparieren (Pietras et al., 1994). Ob dieser Effekt über Her-2/*neu* selbst oder über die auf Chromosom 17q21 benachbarten Topoisomerase II α vermittelt wird, ist unklar (Hengstler et al., 1999).

In Hinblick auf das Ovarialkarzinom sind die in den letzten Jahren veröffentlichten Ergebnisse überaus widersprüchlich. Die unterschiedlichen Aussagen beziehen sich dabei sowohl auf die Frequenz, mit der Her-2/*neu* Genamplifikationen in Ovarialkarzinomen nachweisbar sind (5%-72%), wie auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumorstadium, Tumorgrad, Überleben und dem Her-2/*neu* Status, wie auch auf die Rolle des Gens als unabhängiger prognostischer Faktor.

Bei der folgenden vergleichenden Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Daten anderer Studien müssen insbesondere die verschiedenen Nachweis-Methoden und die entsprechenden Zielstrukturen (Gen oder Rezeptor) berücksichtigt werden. Dabei gilt die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung als die objektivste und bei entsprechender Handhabung und Auswertung zuverlässigste Technik (Ellis et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit fand sich bei den Ovarialkarzinomen in der FISH eine Amplifikation in 6,8% (10/146) und in 5,5%

(8/146) eine Polysomie. Im Vergleich mit bislang veröffentlichten Daten sind dies relativ niedrige Raten. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Genstatus einerseits und dem Tumorstadium, sowie dem Kerngrading als prognostisch etablierten Faktoren andererseits. Das Überleben der Patientinnen erschien ebenfalls durch die Genveränderung unbeeinflusst.

Als zusätzliche Untersuchung wurde eine immunhistochemische Analyse mit dem polyklonalen Antikörper Herceptin® durchgeführt. Dieser Test wird sowohl von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA / USA), wie auch von dem englischen National Institute of Clinical Excellence (NICE, London, UK) für den Nachweis des Her-2/*neu* Rezeptors an Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Material in der Diagnostik des Mammakarzinoms empfohlen.

Unter den Ovariakarzinomen fand sich in 11 Fällen (11/163 bzw. 6,7%) eine Überexpression des Rezeptors. Diese Zahl setzt sich aus 6 Fällen mit einem Hercep-Score von 2+ und 5 Fällen mit einem Hercep-Score von 3+ zusammen. Dem gegenüber stehen 152 Fälle, die als negativ (0/1+) gewertet wurden. Dabei ergab sich kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie und dem histopathologischen Tumorgrad und dem Tumorstadium.

Erste Daten wurden zu Her-2/*neu* bei Ovariakarzinomen 1989 veröffentlicht (Slamon et al., 1989). Wie in den Studien bei Mammakarzinomen fand die Arbeitsgruppe eine Rate von 26% Genamplifikationen sowie eine hoch signifikante direkte Korrelation dieses Faktors mit dem Überleben der 120 untersuchten Patientinnen. In der univariaten Analysen war das mittlere Überleben der Patientinnen direkt assoziiert mit dem Niveau der Amplifikation (keine Amplifikation = diploider Gensatz, low grade Amplifikation = zwei- bis fünffacher Gensatz, high grade = über fünffacher Gensatz). Die Untersuchung erfolgte mittels Southern blot analog zu den Untersuchungen an Mammakarzinomen. Während seine Ergebnisse zu den Mammakarzinomen bis heute vielfach reproduziert wurden, sind die Ergebnisse zu den Ovariakarzinomen umstritten. Allgemein gilt die verwendete blotting Methode als störanfällige Technik. Es besteht grundsätzlich das Risiko einer „Verunreinigung“ der Proben durch Stroma- oder Entzündungszellen. Wäre das jedoch der Fall, würde man eher niedrigere Ergebnisse erwarten als sie in Folgestudien erhoben wurden, die als „in situ“ Analysen durchgeführt wurden. Die Daten, die Slamon 1989 veröffentlichte befinden sich aber im oberen Bereich der

bislang veröffentlichten Ergebnisse zu Her-2/*neu* Veränderungen bei Ovarialkarzinomen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kam Hengstler und Mitarbeiter (Hengstler et al., 1999). Er untersuchte die Her-2/*neu* spezifische mRNA mittels reverser semiquantitativer (rs-) PCR. In 27% der untersuchten Fälle (21/77) fand er einen Wert oberhalb der 3.Quartile. Es zeigte sich dabei nicht nur ein Zusammenhang der Ergebnisse mit dem Tumorstadium und dem Überleben, sondern es stellt sich der Her-2/*neu*-mRNA-Status als unabhängiger prognostischer Faktor dar. Interessanter Aspekt dieser Untersuchung war, dass der Her-2/*neu*-Wert nur in der Patientengruppe ausschlaggebend für das Überleben war, die eine Chemotherapie mit Cis- bzw. Carboplatin und Cyclophosphamid erhielten. In dieser Gruppe hatten die Patientinnen mit einer hohen Zahl an Her-2/*neu* Genkopien eine deutlich reduzierte Überlebenszeit (Hengstler et al., 1999).

Nur eine Studie analysierte bislang sowohl den Status des Her-2/*neu* Gens als auch die Expression des Rezeptors. Fajac et al führten an 65 Tumorproben Southern und Northern Blot und ergänzend hierzu eine immunhistochemische Analyse durch. In Bezug auf die Amplifikationsfrequenz kommen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe. Es fand sich in 14% der Adenokarzinome (9/65) eine Genamplifikation ohne Assoziation dieses Faktors mit einem der prognostisch relevanten Parameter. In der univariaten Analyse schien Her-2/*neu* eine prognostische Wertigkeit zu besitzen, die sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht bestätigen ließ. Überraschend ist das Ergebnis des Vergleichs von Gen und Rezeptor. Die Immunhistochemie zeigte in 44% der Fälle (23/52) eine Überexpression. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Rezeptorexpression und dem Genstatus nachgewiesen werden. Dieser Teilaspekt der Studie von Fajac steht im krassen Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier fand sich, wie aus entsprechenden Studien beim Mammakarzinom zu erwarten, eine hochgradige Korrelation der Ergebnisse beider Tests (siehe unten).

In einer Studie von Rubin et al. 1992 wurden 105 Tumorproben mit Hilfe der Immunhistochemie für Her-2/*neu* untersucht. Alle Patientinnen befanden sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III oder IV). 24% der Fälle (25/105) zeigten eine starke membranöse Anfärbung der Tumorzellen, weitere 11 (10%) eine moderate. Verwendet wurde der monoklonale Antikörper 9G6. Diese Werte liegen deutlich über den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen kommen die Autoren zu der

Schlussfolgerung, dass es keinen Zusammenhang zwischen Rezeptorstatus und Prognose gibt.

Einen zusätzlichen Aspekt beleuchtet die Arbeit von Hellström und Mitarbeitern (2001). Hier wurden 20 Zelllinien von Ovarialkarzinomen, entweder aus dem Primärtumor oder aus malignem Aszites kultiviert und untersucht. Diese Zellen wurden zunächst mindestens vier Wochen inkubiert und in der Folge nach Markierung durch murine anti-Her-2/*neu* Antikörper mittels FACS Analyse ausgewertet. In 75% der Zelllinien war der Rezeptor auf mehr als 50% der Zellen vorhanden. Dies traf auch für Zellen zu, die bei einer primären histologischen Untersuchung negativ bewertet wurden waren. Die Schlussfolgerung dieser Autoren war, dass die Her-2/*neu* überexprimierenden Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Her-2/*neu* negativen Tumorzellen besitzen und durch die lange Kulturzeit selektiert wurden. Überträgt man diesen Gedankengang *in vivo*, sollten Tumoren eines fortgeschrittenen Tumorstadiums eine höhere Rate an Her-2/*neu* Genamplifikationen im Vergleich zu niedrigeren Tumorstadien aufweisen. Diese These findet durch die von uns erhobenen Ergebnisse keinen Beleg. Die wenigen Fälle mit Amplifikation (10/146) zeigten keinerlei Assoziation mit dem Tumorstadium (FIGO I: 10,7%, FIGO II: 0%; FIGO III: 5,6%; FIGO IV: 25%). Hinzu kommt, dass ein hier noch nicht berücksichtigter Fall eines Borderline-Tumors eine hohe Genamplifikation zeigte. Dem gegenüber seien hier die Ergebnisse der Studie von Afify et al. (1999) angesprochen. Diese Arbeitsgruppe untersuchte Ovarialkarzinome ebenfalls mit Hilfe der FISH. Bei 23 serösen Ovarialkarzinomen fanden sie eine im Vergleich zu anderen Studien auffallend hohe Frequenz von 52% Genamplifikationen. Es wurde eine Standard-FISH-Technik benutzt. Dabei ergab sich eine signifikant höhere Rate an Amplifikationen in den Proben von Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorstadium. 2/9 Tumoren im Stadium FIGO I zeigten eine entsprechende Veränderung und 10/14 Tumoren im Stadium III. Damit bestätigte sich anscheinend die oben erwähnte Theorie. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind jedoch aufgrund stark vom üblichen Vorgehen abweichender Auswertungskriterien zu kritisieren. Die Grenze für Amplifikation wurde bereits bei einem Quotienten aus Gensignal und Zentromersignal bei 1,5 gesetzt (Auswertungskriterien der FISH nach Mark et al. 1998 und 1999). 11 der 12 amplifizierten Fälle lagen dabei im Bereich eines Quotienten von 1,5 und 2,0. Nur ein Fall erreichte einen Wert von 3,4. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswertungskriterien von Pauletti et al. 2000

angewandt (siehe Material und Methode). Überträgt man diese strengen Kriterien auf die Daten von Afify et al., wäre nur ein einziger Fall als amplifiziert gewertet worden.

Zahlreiche weitere Studien konnten ebenso keinen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Her-2/*neu* Status feststellen, beispielsweise die zuvor aufgeführte Arbeit von Rubin et al. 1992, die unter 105 Tumoren in 24% der Fällen im Stadium III und IV eine Überexpression fand. Diese im Vergleich zu Hellström et al. geringe Frequenz von Her-2/*neu* positiven Tumoren in fortgeschrittenen Tumorstadien widerspricht der Idee einer Selektion. Auch Bookman et al. 2003, die, mit dem Ziel einer klinischen Herceptin®-Studie, Präparate von 837 Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv auf eine Rezeptorüberexpression untersuchten, kamen lediglich auf eine Rate von 11,4% mit einem Score von 2+ oder 3+ bei Patientinnen mit offensichtlich fortgeschrittenem und teilweise vorbehandeltem Tumorleiden.

Weitere Daten lieferte eine Studie von Skirnisdóttir et al. 2001. Ihr Kollektiv setzte sich aus 106 Ovarialkarzinomen im Stadium I und II zusammen. Die Gewebeproben wurden mit einem Immunfärbeautomaten der Firma Ventana untersucht. 18% der Tumoren (20/106) zeigten dabei eine positive Reaktion. Wiederum ergab sich keine Korrelation zu einem der etablierten Prognoseparameter. Als ein Ergebnis dieser Studie ist die relative Häufung von Her-2/*neu* positiven Fällen von muzinösen Tumoren zu erwähnen, was sich in der vorliegenden Arbeit bestätigte. Auch in unseren Untersuchungen wiesen die muzinösen Tumoren im HercepTest® eine statistisch signifikante Häufung von hoch positiven Ergebnissen im Vergleich zu den anderen histopathologischen Differenzierungstypen auf. Dieses Ergebnis fand allerdings in der FISH Untersuchung keine Korrelation auf Genebene.

Eine Rate von 32% von Fällen mit Rezeptorüberexpression veröffentlichten Berchuck et al. 1990. Sie nutzten dabei den monoklonalen Antikörper TA1 und kamen zu dem Schluss, dass Patientinnen mit einer Überexpression eine deutlich schlechtere Prognose haben. Wie bereits erörtert, ist die Technik der Immunhistochemie eine semiquantitative Methode, deren Ergebnisse relativ stark untersucherabhängig sind. Dies zeigt sich innerhalb dieser Studie an der Tatsache, dass bei zweimaliger voneinander unabhängiger Beurteilung der Schnitte es in fast 10 % der Fälle zu einem abweichenden Ergebnis kam. Zudem berichteten Berchuck et al. von einer schwachen bis moderaten (0-2+) Anfärbung des normalen Ovariepithels in 5 von 6 Fällen, wo hingegen das Ovarstroma negativ blieb. Aus

heutiger Sicht spricht dies für eine unspezifische Anfärbung durch den benutzten Antikörper.

Eine andere Methode zum Nachweis von *Her-2/neu* wurde von Medl et al. 1995 angewandt. Diese Arbeitsgruppe bediente sich der quantitativen PCR zur Untersuchung des *Her-2/neu* Gens. Die Ergebnisse lagen mit 40% amplifizierten Fällen (79/196) im oberen Bereich der bekannten Werte. Korrelationen zu anderen Parametern insbesondere zum Überleben konnte wiederum nicht nachgewiesen werden. Somit ist auch dieses Resultat ein Beleg für das heterogene Bild von *Her-2/neu* Veränderungen im Ovarialkarzinom.

Høgdall et al. 2003 untersuchten in einem großen Kollektiv von 181 Patientinnen in unterschiedlichen Tumorstadien die Frequenz der *Her-2/neu* Rezeptor Expression mittels des auch in der vorliegenden Studie benutzten Antikörpers HercepTest® (DAKO). Auf den ersten Blick überrascht die große Zahl von 52% Fällen mit Überexpression (95/181). Allerdings wurde hierbei auch der Hercep-Score von 1+ als positiv im Sinne einer Überexpression interpretiert. Zieht man diese 1+ Fälle von den 2+ und 3+ ab, so bleiben lediglich 13,3% (24/181) übrig. In der vorliegenden Arbeit ergab sich eine Rate von 6,7% (11/163). Die Zusammenfassung aller Fälle mit einem Hercep-Score ungleich 0 zu einer Gruppe begründete die Arbeitsgruppe mit dem hier nachweisbaren signifikanten Zusammenhang des HercepTest® Ergebnisses mit dem Überleben. Dieses Vorgehen widerspricht den derzeit in der Diagnostik von Mammakarzinomen gängigen Bewertungskriterien und den Empfehlungen des Herstellers. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Kriterien eben nicht an Ovarialkarzinomen, sondern primär in Hinblick auf Karzinome der Mamma etabliert wurden. In der eigenen Untersuchung ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Überleben und einem HercepTest®-Score ungleich 0 darstellen.

Eine der aktuellsten Studien legten Verri et al. 2005 vor. Auch in dieser Studie wurde mit dem HercepTest® an einem großen Kollektiv von 194 Fällen gearbeitet. Die Ergebnisse in Bezug auf Karzinome mit einem Hercep-Score von 2+ (8,2% bzw. 16/194) oder 3+ (5,7% bzw. 11/194) sind vergleichbar mit denen von Høgdall et al. (13,3% für 2+/3+ zusammen). Im Unterschied zu Høgdall et al. konnte in dieser Studie auch für 2+/3+ Fälle allein ein negativer Einfluss des Rezeptorstatus auf das Gesamtüberleben der Patientinnen gezeigt werden. In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab sich dieser Aspekt vor allem in den niedrigen

Tumorstadien (FIGO I und II) und wies auch nur in dieser Gruppe in der multivariaten Analyse einen negativen Zusammenhang mit dem Überleben bzw. dem Progress der Erkrankung auf. Damit widerspricht er der zuvor angesprochenen These der besonderen Bedeutung von *Her-2/neu* für fortgeschrittenere Tumorstadien (Afify et al., 1999). Keine Korrelation konnte zu anderen prognostischen Parametern gefunden werden.

Makar et al. 1994 benutzten im Gegensatz zu den bislang besprochenen Studien den monoklonalen Antikörper NCL-CB11, der gegen die intrazelluläre Domäne des *Her-2/neu* Rezeptors gerichtet ist. Dieser Antikörper wurde zuvor an Mammakarzinomen erprobt und brachte dort befriedigende Ergebnisse. Eine membranöse Anfärbung der Tumorzellen wurde in nur 5,4% der Fälle (4/74) gefunden. Die Autoren erklärten die im Vergleich zur anderen Arbeiten niedrigen Werte mit der Einhaltung strikter Auswertungskriterien. In zusätzlichen 14,8% (11/74) Tumoren wurde eine rein zytoplasmatische Anfärbung beschrieben, die jedoch nicht als positiv gewertet wurde. Die Überexpressionsfrequenz in der beschriebenen Studie stimmt mit den eigenen Beobachtungen nahezu vollständig überein. Zudem ergab sich in der Arbeit von Makar et al. weder einen Anhalt für eine prognostische Relevanz von *Her-2/neu*, noch einen Zusammenhang zu anderen bekannten prognostischen Parametern. Es ist bekannt, dass monoklonale Antikörper im Vergleich zu polyklonalen eine höhere Selektivität besitzen und so zu niedrigeren Ergebnissen führen. Zu diesem Schluss kamen auch Lebeau et al. beim direkten Vergleich monoklonaler (9G6, 3B5, CB11, TAB250, GSF-Her2-neu) und polyklonaler (A8010, A0485, HercepTest®) Antikörper an Mammakarzinomgeweben (Lebeau et al., 2001). Allerdings führten auch Berchuck et al. (1990) ihre Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper durch und kamen auf eine Überexpressionsrate von 32%.

Es bleibt festzustellen, dass bei der Vielzahl der mittlerweile veröffentlichten Studien keine einheitliche Methodik zur Anwendung kam. Vor diesem Hintergrund ist es schwierig, die einzelnen Ergebnisse direkt miteinander zu vergleichen. Eine Vereinheitlichung der Untersuchungsmethoden und der Auswertungskriterien würde zu einer allgemeinen Verbesserung diesbezüglich führen und wird in der Diagnostik von Mammakarzinomen angestrebt (Hanna, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Schritt in diese Richtung zu gehen. Die durchgeführten Untersuchungen orientierten sich an dem aktuellen Standard der Her-2/*neu* Diagnostik. Durch die parallele Durchführung zweier Methoden, die unterschiedliche molekulare Ebenen des Her-2/*neu* darstellen, wurden die Ergebnisse besonders aussagekräftig. Eine solche vergleichende Studie an einem verhältnismäßig großen Kollektiv wurde bislang nicht veröffentlicht. Unsere Ergebnisse unterstreichen die sich durchsetzende Meinung, dass Her-2/*neu* an malignen epithelialen Tumoren des Ovars keinen entscheidenden Stellenwert in Diagnostik und Therapie einnimmt.

Abschließend sei an dieser Stelle noch einmal auf die zuvor kurz angeführte Studie von Bookman et al. aus dem Jahr 2003 eingegangen. Ziel der Arbeit war die Evaluation einer Herceptin®-Therapie an Patientinnen mit Rezidiv eines Ovarialkarzinoms. Für diese Autoren überraschend, jedoch unseren Ergebnissen entsprechend, konnten mit einer Kombination zweier monoklonaler Antikörper (4D5 und CB11) unter den 837 untersuchten Karzinomen nur 11,4% mit einem Expressionsscore von 2+ oder 3+ gefunden werden. Im Vergleich hierzu liegt die Überexpressionsrate bei Mammakarzinomen bei 20-30%. Unter den 41 Patientinnen, die schließlich in die klinische Phase II Studie eingeschlossen wurden, kam es lediglich zu zwei partiellen und einer kompletten Remission (7,3%). Damit lag die Ansprechrate deutlich niedriger als bei vergleichbaren Studien bei Mammakarzinomen (12-15%). In Hinblick auf die große Zahl von Patientinnen, die getestet worden waren, war das Ergebnis zu gering, um weiterführende Untersuchungen zu rechtfertigen.

Sicher ist, dass das Ovarialkarzinom auch in Zukunft Ziel weiterführender Untersuchungen sein muss, um den betroffenen Patientinnen zusätzliche therapeutische Optionen zu ermöglichen.

5.1.2 Borderline-Tumoren

Die Stellung der epithelialen Ovarialtumoren von Borderline Malignität (Synonym: Tumoren von niedrig malignem Potential (low malignant potential = LMP) ist umstritten. (Seidmann et al., 2000). Es handelt sich um intraovariell oder an der

Ovaroberfläche wachsende zystische Tumoren. Im Unterschied zu Zystadenomen zeigt ihr Epithel histologische Merkmale der Proliferation und der zellulären Atypie. Die Stromainvasion ist, falls überhaupt vorhanden, auf ein Areal von $< 10 \text{ mm}^2$ beschränkt und hat dabei keinen Einfluss auf die Prognose. Die Stadieneinteilung erfolgt analog zu den Ovarialkarzinomen. Borderline-Tumoren grenzen sich durch ihre gute Prognose von den klassischen Ovarialkarzinomen ab. Die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 bzw. 10 Jahren liegt auch im Stadium III mit 55-75% deutlich höher als bei Ovarialkarzinomen mit 20-30%. Unklar ist der Entstehungsmechanismus so genannter „Implantate“. Darunter versteht man extraovarielle Läsionen des peritonealen Überzugs von gleichartiger Morphologie wie die ovariellen Primärherde. Denkbar sind sowohl eine „metastasenartige“ peritoneale Streuung wie eine synchrone multifokale Tumorentstehung. Entscheidend für die Einschätzung des Wachstumsverhaltens ist die Einordnung dieser Implantate als nicht invasiv oder invasiv wachsend (Diebold et al., 2004).

Es ist bis heute nicht klar, ob dieser Tumortyp eine eigenständige Gruppe ovarieller Neoplasien ist oder eine Art Übergangsform vom Adenom zum Karzinom darstellt. Eine aktuelle Theorie diskutiert eine schrittweise Entwicklung hoch differenzierter seröser Ovarialkarziome aus serösen und mikropapillären Borderline-Läsionen (Shih et al., 2004; Sieben et al., 2004). Diese These stützt sich auf den Nachweis von Punktmutationen im BRAF und KRAS Gen in Borderline-Tumoren und hoch differenzierten serösen Karzinomen in einer vergleichbar hohen Frequenz. Mutationen von BRAF und KRAS sind hingegen in so genannten high-grade Ovarialkarzinomen deutlich seltener nachzuweisen (Singer et al., 2002 und 2003). Für diese als high grade bezeichneten Karzinome, zu denen entdifferenzierte Karzinome des Ovars und gering differenzierte seröse und endometrioide Karzinome gezählt werden, wird daher eine de novo Entwicklung direkt aus dem ovariellen Deckepithel angenommen (Kurman et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden 36 Borderline-Tumoren auf ihre Veränderungen bezüglich des Her-2/*neu* Gens und des Her-2/*neu* Rezeptors untersucht. Unter allen auswertbaren Tumoren (31/36) fand sich ein Fall mit einer hohen Amplifikation des Gens, bzw. einer Rezeptorüberexpression (1/31, 3%). Es handelte sich dabei um einen Tumor muzinöser Differenzierung, der ansonsten keine weiteren klinischen oder histopathologischen Auffälligkeiten aufwies. In vergleichbarer Frequenz

beschrieben Dimova et al. (2006) an einem Tissue Microarray mittels FISH einen Zugewinn des *Her-2/neu* Gens in den untersuchten Borderline-Tumoren (6,25% bzw. 1/15). Medl et al. (1995) hingegen fanden in ihrer Studie mit Hilfe der quantitativen PCR Genamplifikationen sogar in 70% der untersuchten Borderline-Tumoren (7/10). Fajac et al. (1995) konnten weder auf DNA (0/8) noch auf mRNA (0/5) Ebene eine Veränderung des *Her-2/neu* Gens nachweisen.

Wie bereits in der Diskussion über die Ergebnisse an Ovarialkarzinomen dargelegt, so zeigt sich auch hier eine große Spannweite in den angewandten Techniken. Dies ist vielleicht eine Erklärung für die Varianz der Ergebnisse.

Dennoch ist dieses Resultat als Hinweis darauf zu werten, dass eine Amplifikation des *Her-2/neu* Gens kein Phänomen eines fortgeschrittenen Tumorleidens ist, sondern bereits bei niedriger Malignität auftreten kann. Eine abschließende Aussage ist allerdings aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Tumoren nicht möglich. In Hinblick auf die eingangs vorgestellte Theorie des Tumorprogressionsmodel mit Borderline-Tumoren als Übergangsläsion zu hoch differenzierten Karzinomen lassen sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen des *Her-2/neu* keine weiteren Schlüsse ziehen. Ein signifikanter Unterschied in der Frequenz von *Her-2/neu* Veränderungen zwischen der Gruppe der low-grade Karzinome und der Gruppe der high-grade Karzinome ließ sich nicht nachweisen und entsprechend dazu auch keine vergleichbare Frequenz in der Gruppe der Borderline-Tumoren und der Gruppe der low-grade Karzinome belegen.

5.1.3 Maligne Müller`sche Mischtumoren

Maligne Müller`sche Mischtumoren sind Neoplasien, die aufgrund ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes auch synonym als Karzinosarkome oder metaplastische Karzinome, im englischen Sprachraum als „malignant mixed mesodermal tumor“ (MMMT) bezeichnet werden (Lee et al., 2004; Brown et al., 2004). Diese Art von Tumoren findet man sowohl am Uterus (hier in einer höheren Frequenz) wie auch am Ovar, wobei sie dort 1-2 % der ovariellen Malignome ausmachen. Sie imponieren dabei insbesondere durch ihr extrem aggressives Wachstum. Die Diagnosestellung erfolgt meist erst im fortgeschrittenen Stadium (FIGO IIIC oder IV). Betroffen sind meist Frauen jenseits der 5. Lebensdekade. Die mittlere Überlebenszeit nach Primärdiagnostik liegt zwischen sechs und zwölf

Monaten (Gutschow et al., 2004). Die Abgrenzung dieser Tumoren von den übrigen (bereits besprochenen) epithelialen Tumoren des Ovars ist von pathologischer Seite aufgrund des anderen morphologischen Bildes begründet. Von klinischer Seite ist diese Unterscheidung aufgrund der schlechteren Prognose mit deutlich kürzerem Überlebensintervall ebenfalls sinnvoll (Harris et al., 2003; Brown et al., 2004).

Die Morphologie dieser Tumoren ist überaus heterogen. Sie besitzen histologisch in variablem Verhältnis sowohl karzinomatöse als auch sarkomatöse Anteile. Die Entstehung beider Komponenten und ihre Beziehung zueinander werden kontrovers diskutiert. Molekularpathologische Untersuchungen zum besseren Verständnis der Tumorgenese wurden insbesondere am p53 Tumorsuppressorgen, sowie u.a. am KRAS Onkogen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten unterstreichen das monoklonale Tumorentstehungsmodell, das besagt, dass beide Tumorkomponenten aus einer Tumorstammzelle entstehen (Kombinationsmodell) (Mayall et al., 1994; Szukala et al., 1999; Jin et al., 2003). Die dargestellten Studien beschäftigten sich mit genetischen Mutationen, die für eine gemeinsame Stammzelle beider Tumorbestandteile sprechen. Eine umfassende Analyse des Her-2/*neu* Genstatus bei ovariellen Karzinosarkomen ist bislang nicht durchgeführt worden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass sich histomorphologische Variabilität auf quantitativ-genetischer Ebene widerspiegeln, denn weniger als die Hälfte der untersuchten Tumoren (5/13) zeigte ein durch alle Stenzen hindurch einheitliches Muster bezüglich der Veränderungen des Her-2/*neu* Gens. Die übrigen wiesen beim Vergleich mehrerer Stenzen ein und desselben Tumors unterschiedlichste numerische Abweichungen des Gens (Polysomie, Monosomie, schwache und starke Amplifikation) auf. Dabei ließ sich keine einheitliche Zuordnung von Genveränderungen und Histologie zeigen.

Aufgrund der insgesamt nur geringen Amplifikationsfrequenz (2/13 Tumoren, bzw. 2/37 Stenzen) erscheint Her-2/*neu* für das aggressive Wachstumsverhalten der malignen Müller'schen Mischtumoren von untergeordneter Rolle zu sein. Zudem konnte kein negativer Einfluss der Genamplifikation auf die Prognose der betroffenen Patientinnen nachgewiesen werden. Eine systemische Therapie mit Herceptin® ist somit nicht begründet.

5.1.4 Granulosazelltumoren

Granulosazelltumoren sind die häufigsten Neoplasien des differenzierten Gonadenmesenchyms. 75% der Patientinnen sind postmenopausal (adulter Typ) mit einem Altersgipfel zwischen dem 50. und 55. Lebensjahr. Nur 5% manifestieren sich vor dem 20. Lebensjahr (juvener Typ). Tumordurchmesser von 10 cm sind keine Seltenheit. Die Prognose ist in erster Linie abhängig von dem Tumorstadium. Stadium I zeigt eine 10-Jahres-Überlebensrate von 86-96%. Mit zunehmendem Stadium reduziert sich diese Rate deutlich auf 26-49% (Gutschow et al., 2004). 20% der Tumoren zeigen ein malignes Verhalten, wobei eine Aussage darüber oft erst nach langer Beobachtung des Verlaufes möglich ist. Spätmetastasen und –Rezidive können noch nach 20 Jahren auftreten. Eine Bildung von Hormonen, am häufigsten von Östrogen kann eine Endometriumhyperplasie induzieren. In diesem Fall besteht in 5-10% eine Koinzidenz mit Endometriumkarzinomen.

Für die frühzeitige Unterscheidung zwischen einem benignen und malignen Verlauf fehlen bislang verlässliche Kriterien. In vergangenen Studien wurden verschiedene Faktoren wie zelluläre Atypien und Mitoserate auf ihren prognostischen Wert geprüft. Numerische Aberrationen der Chromosomen 12, 14 und 22 sowie Rearrangements des langen Arms des Chromosom 6 (Mayr et al., 2001) wurden beschrieben, haben aber ebenfalls keine prognostische Relevanz.

Über das *Her-2/neu* Gen liegen dabei bislang keine uns bekannten Beobachtungen vor. Die vorliegende Arbeit untersuchte 20 Granulosazelltumoren (17 adulte, 3 juvenile) in Bezug auf mögliche Veränderungen des *Her-2/neu* Gens und des Rezeptor. Diese Tumoren sind Teil eines Kollektivs, anhand dessen bereits mehrere Studien zur genetischen Grundlage von Granulosatumoren durchgeführt wurden (Mayr et al., 2001).

Sämtliche untersuchte Tumoren dieser Gruppe waren in Hinblick auf Veränderungen von *Her-2/neu*, sowohl des Gens wie des Rezeptors, unauffällig. Es ist also unwahrscheinlich, dass dieser Faktor einen maßgeblichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Prognose der Tumoren hat.

5.2 Tissue Microarray

Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (=Herceptin®) ist das Ergebnis einer erfolgreichen Zusammenarbeit von Forschung, Klinik und pharmazeutischer Industrie. Knapp 20 Jahre nach der erstmaligen Beschreibung des *Her-2/neu*-Gens an induzierten Neuroglioblastomen bei Ratten (Shih et al., 1981) wurde Herceptin® für die standardisierte Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms zugelassen. Vor diesem Hintergrund wird intensiv nach weiteren Malignomen gesucht, die für eine Therapie mit Herceptin® in Frage kommen könnten. Grundvoraussetzung für einen breiten therapeutischen Einsatz des Antikörpers ist der Nachweis von *Her-2/neu* Genamplifikationen in einer ausreichenden Zahl von Fällen.

Mit der Methode des Tissue Microarrays ist es möglich, eine große Anzahl von Tumoren unterschiedlichen Ursprungs, Differenzierungsgrades und Tumorstadiums zu analysieren. Bis zu 1000 Gewebeproben werden dabei in einen Paraffinblock eingesetzt. Von diesem Block können bis zu 300 Folgeschnitte angefertigt werden. Diese Schnitte können für nahezu jede Standard- und Spezialfärbung, aber vor allem auch zur immunhistologischen Darstellung von Proteinen und zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung spezifischer DNA-Abschnitte verwendet werden. Zahlreiche Studien über und mit dieser Technik bestätigten den hohen Nutzen (Kononen et al., 1998; Schraml et al., 1999; Simon et al., 2001; Hsu et al., 2002; Milanes-Yearsley et al., 2002; Kluger et al., 2004).

Der Vorteil dieser Methode liegt besonders in der hohen Zeitersparnis. Alle Gewebeproben befinden sich auf einem Objektträger, so dass der zeitliche Aufwand auf ein Minimum reduziert werden kann. In der vorliegenden Arbeit war es möglich, den immunhistochemischen HercepTest® der 282 Gewebeproben innerhalb weniger Stunden auszuwerten. Ein weiterer Vorteil bei der Auswertung der Immunhistochemie am Tissue Microarray war die direkte Vergleichbarkeit der Reaktionsintensität. Es ist bekannt, dass aufgrund der Semiquantitativität bei Auswerten mit niedriger Anzahl auszuwertender Tests pro Zeiteinheit und somit wenigen Vergleichsmöglichkeiten die Tendenz besteht, diese mit einem relativ zu hohen Score zu bewerten (Paik et al., 2002; Roche et al., 2002). Bei der großen Anzahl von Proben auf einem TMA konnte die Färbereaktion der Stenzen untereinander verglichen und somit ein einheitlicher Beurteilungsmaßstab angelegt

werden. Zudem durchliefen sämtliche Proben die verschiedenen Färbeschritte unter denselben Konditionen, was zur höchstmöglichen Vergleichbarkeit führte.

Positiv in der vorliegenden Studie war außerdem, dass das Spendergewebe durch die Probenentnahme nur minimal beschädigt wurde.

Die gewählte Probengröße entsprach 2-3 high power fields (HPF) und ließ eine Beurteilung der Gewebestruktur durchaus zu, so dass eine Unterscheidung von Tumor- zu Bindegewebszellen auch in der FISH gut möglich war. Bei soliden Tumoren waren meist bequem 100 Zellen, bzw. Zellkerne in einer Gewebestanze zu analysieren. Zystisch aufgebaute Tumoren stellten ein Problem dar. Zum Einen war die Zystenwand nur unzuverlässig in dem Stanzzyylinder enthalten, zum Anderen erreichte man nur schwer eine angemessen hohe Zahl an auswertbaren Zellen. Das spiegelte sich auch in unserer Untersuchung wider, da nur 3 von 8 Zystadenomen auswertbar waren.

Kritisch zu diskutieren ist der geringe Durchmesser der Proben von 0,6 mm, was einem Probenvolumen von etwa $1,4 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ entspricht. Der geringe Probendurchmesser provoziert Zweifel bezüglich der Validität der Ergebnisse. Torhorst et al. (2001) zeigten jedoch in einer Studie an 553 Mammakarzinomen, die sie einerseits auf vier TMA-Blöcken und parallel dazu auf den Originalschnitten untersuchten, dass die Ergebnisse von TMA-Proben mit den Originalschnitten gut korrelierten. Dabei wurde nicht nur der meist gleichmäßig exprimierte Östrogenrezeptor beurteilt, sondern auch der häufig heterogen verteilte Progesteronrezeptor und die p53-Expression. Die hohe Anzahl der Proben, die auf einem TMA-Block vorhanden sind, ließen dabei in der statistischen Berechnung die möglicherweise falsch negativen Werte in den Hintergrund treten. Vergleichbare Ergebnisse hatte zuvor bereits eine andere Arbeitsgruppe veröffentlicht (Camp et al., 2000). Die Fragestellung dieser Studie betraf die Repräsentativität der Gewebestanzen beim Tissue Microarray, insbesondere wie viele Stenzen nötig sind, um eine akzeptable Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Tissue Microarray-Gewebestanzen und den Originalpräparaten zu erhalten. Die Untersuchung zeigte, dass bereits das Aufbringen von zwei Stenzen pro Fall zu einer 95 %igen Reproduzierbarkeit führt. Zu entsprechenden Schlussfolgerungen kommt die Arbeitsgruppe um O`Grady. Sie untersuchten die Validität der Ergebnisse eines TMA in Hinblick auf Her-2/*neu* an archivierten Mammakarzinomen. Dabei verglichen sie sowohl Immunhistochemie wie auch FISH am TMA und am

Originalpräparat. Das Resultat bestätigte die hohe Zuverlässigkeit und Praktikabilität der Technik (O`Grady et al., 2003).

Die Repräsentativität der Gewebestanden im Vergleich zum Originalblock erhöhte sich zudem durch die sorgfältige Vorauswahl der Region, aus der später die Stanzzyylinder entnommen wurden.

Von technischer Seite aus zeigte sich eine einfach Handhabbarkeit der Methode. Die Auswertbarkeit beider Untersuchungsmethoden (93% der Tumoren in der Immunhistochemie und 81% der Proben in der FISH) lag im Bereich der in anderen Studien berichteten Werte (Schraml et al., 1999; Moch et al., 1999; Milanes-Yearsley et al., 2002 u.a.). In der zuvor erwähnten Studie von Torhorst et al. (2001) zeigte sich eine deutliche Steigerung der auswertbaren Proben von 70% bzw. 76% auf 96% durch den Einsatz von vier Stanzen pro Tumor. In Abweichung zu der genannten Studie sind in unserer Arbeit die meisten Tumoren durch zwei Stanzen auf den TMA-Blöcken vertreten gewesen.

Vorteile und Nachteile durch die Verwendung von Hilfssystemen bei der Anfertigung und Übertragung der Schnitte auf die Objektträger sowie der Gebrauch von silanisierten Objektträgern werden in diversen Studien unterschiedlich beschrieben. Die Arbeitsgruppen um Schraml (1999) und Moch (1999) sahen in der Verwendung von Tape-Systemen Vorteile aufgrund des geringeren Verlustes von Stanzenmaterial während des Schneidens und des Transfers der Schnitte auf die Objektträger. Andere Arbeitsgruppen schilderten Nachteile bei Verwendung der Hilfssysteme. Hintergrundanfärbung, Verlust von Probenmaterial und Beschädigung des Stanzengewebes konnten reduziert werden, wenn auf die Hilfssysteme verzichtet wurde (Milanes-Yearsley et al., 2002). Unsere TMAs, deren Schnitte ohne Hilfssysteme erstellt wurden, erbrachten bei ähnlichem Versuchsaufbau im Vergleich mit anderen Studien Ergebnisse im oberen Bereich der Erfolgsraten. Auf den Einsatz der kostenintensiven Hilfssysteme kann daher aus unserer Sicht verzichtet werden.

In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Archivmaterial verwendet. Diese Art der Fixierung wird in Hinblick auf die weitere Untersuchung der Proben mittels IHC und FISH empfohlen (Ellis et al., 2004). Es ist aber auch bekannt, dass die Fixation zu einer reduzierten Beurteilbarkeit in den verschiedenen Untersuchungstechniken führen kann. Komplexbildung der Reagenzien mit der DNA bzw. mit Proteinen verschlechtert die

Qualität der Ergebnisse. Kononen et al. (1999) empfahlen nach Vergleich von Formalin und Ethanol fixiertem Material im Rahmen seiner Studie am Tissue Microarray die Ethanol Fixierung für Fluoreszenz-Untersuchungen. Wichtig erscheint aber vor allem, dass die untersuchten Gewebe auf ein und dieselbe Art fixiert werden, da nur so die Vergleichbarkeit erhalten bleibt. Vor demselben Hintergrund entwickelte die Arbeitsgruppe um Schoenberg-Fejzo (2001) die Technik des Tissue Microarray fort. Um die Probleme der Formalin-Fixation zu umgehen, benutzten sie Gefriermaterial und setzten die gefrorenen Gewebeproben in einen Block mit „OCT compound“ als Einbettmedium ein. Diese Technik mag zu Vorteilen in der Qualität der Untersuchungstechniken von DNA, Proteinen und vor allem RNA bringen, doch weist sie einen deutlich komplizierteren Versuchsaufbau auf. Das Probenvolumen solcher Blöcke ist zudem erheblich reduziert. Kann ein herkömmlicher Tissue Microarray bis zu 1000 Probenstanzen enthalten, bringt es dieser Frozen Tissue Microarray auf etwa 100 Probenstanzen. Retrospektive Studien an archiviertem Material schließen sich aus.

5.3 Wertigkeit der Immunhistochemie (Herceptin®) im Vergleich zu Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Mit der Zulassung des Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) wurde 2000 eine neue Behandlungsoption in die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms eingeführt. In zahlreichen Studien ist seither der positive Effekt der Therapie auf das rezidivfreie Intervall und auch das Gesamtüberleben der Patientinnen bestätigt worden. Aktuell werden zahlreiche Studien u.a. zum neoadjuvanten Herceptin®-Einsatz durchgeführt. Klarer Vorteil des Antikörpers gegenüber einer systemischen Chemotherapie ist die relative Selektivität, mit der Herceptin® auf die Tumorzellen wirkt. Eine korrekte Auswahl der in Frage kommenden Patientinnen ist sowohl aus medizinischer wie auch aus sozioökonomischer Sicht wichtig. Sie ist die Voraussetzung für eine sinnvolle und erfolgreiche Therapie. Vom medizinischen Standpunkt ist zu berücksichtigen, dass die Antikörpertherapie mit möglichen unerwünschten Wirkungen einhergehen kann. Als gravierendste Nebenwirkung ist das Neuauftreten oder die Verschlechterung einer vorbestehenden kardialen Pumpstörung beschrieben.

Der sozioökonomische Standpunkt fordert bei Therapiekosten von knapp 30.000 Euro pro gewonnenes Lebensjahr (Monte-Carlo-Simulation) (Quelle: Herceptin®-Produktmonografie) zudem einen rationalen Einsatz des Medikaments.

Erster Schritt bei der Auswahl in Frage kommender Patientinnen für eine Herceptin®-Therapie ist die Erhebung des Her-2/*neu*-Rezeptorstatus. Nur bei Nachweis einer Überexpression des Her-2/*neu* Rezeptors in der Immunhistochemie bzw. bei Nachweis einer Amplifikation des Her-2/*neu* Gens in der FISH ist der Einsatz von Herceptin® zulässig.

Dies setzt voraus, dass geeignete Testmethoden zu Verfügung stehen. Diese müssen ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität aufweisen, müssen zudem reproduzierbar sein und sich durch eine hohe objektive, standardisierte Beurteilbarkeit auszeichnen. Von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) sowie durch das National Institute of Clinical Excellence (NICE) wird derzeit der immunhistochemische Nachweis des Her2/*neu* Rezeptors mittels des polyklonalen Antikörpers HercepTest® (DAKO, Glostrup, Dänemark) vorgeschrieben. Für die Untersuchung des Her-2/*neu* Gens stehen zurzeit zwei kommerzielle Tests zur Auswahl: Inform®-Her-2/*neu* Kit (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) und PathVysion™ Her-2 DNA Sonden Kit (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). Aufgrund der Etablierung von Herceptin® in der Therapie des Mammakarzinoms wurden die Anwendungsprüfungen für entsprechende Tests vor allem an diesen Geweben durchgeführt. In der Literatur findet sich in Hinblick auf Ovarialkarzinome nur eine Arbeit, die beide Nachweisebenen, also Rezeptor und Gen, an demselben Kollektiv zueinander in Beziehung setzt (Fajac et al., 1995). Daher muss bei dem Vergleich der Ergebnisse von Immunhistochemie und FISH im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitgehend auf Daten von Mammakarzinomen zurückgegriffen werden.

In zahlreichen Studien wird beschrieben, dass eine hoch positive Immunhistochemie (3+) in nahezu allen Fällen mit einer Amplifikation auf Genebene einhergeht (Jacobs et al., 1999a; Kay et al., 2004). Bei schwacher positiver Immunhistochemie (2+) besteht in 25% der Fälle eine Genveränderung, die eine Therapie rechtfertigt (Pauletti et al., 2000; Lebeau et al., 2001). Daher besteht das akzeptierte diagnostische Regime, dass entweder bei einem stark positiven HercepTest® (3+) oder bei einem „moderat“ positiven HercepTest® (2+) und dem zusätzlichen

Nachweis einer Genamplifikation in der nachgeschalteten FISH eine Herceptin®-Therapie indiziert ist (Lebeau et al., 2001; Schnitt et al., 2001; Ellis et al., 2004).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob sich die hohe Konkordanz zwischen HercepTest® und FISH, die durchschnittlich bei etwa 90 % liegt (Hanna 2001), sowie bislang an Mammakarzinomen veröffentlichte Ergebnisse über falsch positive und falsch negative Ergebnisse der Immunhistochemie an dem vorliegenden Material mittels eines Tissue Microarrays reproduzieren lassen.

In dieser Arbeit kam für die FISH der Testkit „PathVysion“ von Vysis/Abbott zum Einsatz. Dieser Test hat gegenüber dem „Inform“ von Ventana den Vorteil, dass er als Zwei-Farben-FISH eine zusätzliche parallele Bewertung der Zentromerregion des Chromosoms 17 zulässt. Dadurch kann eine Genamplifikation von einer Polysomie eindeutig abgegrenzt werden.

Im Vergleich der Ergebnisse von FISH und Immunhistochemie zeigte sich eine hohe Übereinstimmung. Betrachtet man alle Gewebeproben, so ist das Ergebnis hoch signifikant. Alle Gewebestanden mit hochgradiger Amplifikation wurden in der Blindauswertung mit 2+ oder 3+ in der Immunhistologie bewertet (Spezifität = 100%). Dieses Ergebnis spiegelt die Daten der Literatur wieder (Jacobs et al., 1999a; Hoang et al., 2000; Hanna, 2001). Dabei unterstellt man bzw. setzt voraus, dass eine Vermehrung der Kopienzahl des *Her-2/neu* Gens mit hoher Gesetzmäßigkeit zu einer verstärkten Rezeptorexpression führt. Dies ist bislang für Mammakarzinome bewiesen. Nach unseren Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit verhalten sich Ovarialkarzinome vergleichbar.

176 Fälle ohne Amplifikation wurden korrespondierend mit negativem HercepTest® bewertet. Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Zuverlässigkeit der Immunhistochemie und bestätigt die Zulässigkeit des in der Klinik angewandten diagnostischen Algorithmus.

Diskrepanz erscheinen 2 Fälle, die in der FISH als gering amplifiziert gezählt wurden, in der Immunhistochemie jedoch keine vermehrte Expression (falsch negativ) zeigten. Aus Sicht der FISH bestünde bei diesen Fällen eine Indikation zur Therapie mit Herceptin. In der klinischen Diagnostik wären diese Fälle jedoch nicht aufgefallen, da sie bei einem negativen (0) oder schwach positiven (1+) HercepTest® routinemäßig nicht in die Fluoreszenz-Diagnostik eingegangen wären. Für das Zustandekommen dieser „falsch negativen“ Fälle gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Es wird beschrieben, dass es bei der Durchführung von

immunhistochemischen Untersuchungen an Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Material zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, da bei der Fixierung Komplexe zwischen Proteinen und Bestandteilen der Fixationslösung gebildet werden (Schönberg-Fejzo et al., 2001). Besser für diese Analyse geeignet ist tiefgefrorenes Material (Penault-Llorca et al., 1994).

Bezogen auf die Diagnostik bei Mammakarzinomen wäre diesen Patientinnen aufgrund der negativen Immunhistochemie eine Therapie mit Herceptin® nicht angeboten worden, wenn gleich nach der FISH durch die schwache Genamplifikation eine Therapieindikation bestanden hätte. Es handelt sich hierbei um zwei seröse Karzinome (G2/FIGO III, Probe aus dem Jahr 1992, bzw. G3/FIGO IV, Probe aus dem Jahr 1985). Das Alter des Probenmaterials von über 10 Jahren kommt als Ursache der falsch negativen Immunhistochemie insofern in Frage, da 1993 die Fixierung institutsintern von 10% auf 4% gepuffertes Formalin umgestellt wurde, was zur Störung der Testergebnisse geführt haben könnte (Penault-Llorca et al., 1994).

Jedoch werden ähnliche Ergebnisse auch von anderen Autoren beschrieben. Jacobs et al. fanden 1999 bei 90 untersuchten Mammakarzinomen in 23 Fällen eine Amplifikation in der FISH. Fünf dieser Fälle zeigten keine Expression in der IHC. Dabei war auffällig, dass 4 dieser 5 Fälle nur gering amplifiziert waren. In diesem Punkt decken sich ihre Resultate mit unseren Ergebnissen. Als Lösungsansatz diskutierten die Autoren eine „Downregulation“ der Gentranskription und / oder der Translation, möglicherweise auch ein verändertes Proteinprodukt, dass somit durch die Immunhistochemie nicht mehr erkannt und adäquat markiert wurde. Die von ihnen erwogenen Polysomien, die der Veränderung zugrunde gelegen haben könnten, können wir ausschließen. Während Jacobs et al. eine reine Her-2/*neu*-Gensonde in der FISH benutzten, führten wir unsere Untersuchung mit einer Zwei-Farben-FISH durch. Diese ermöglichte den direkten Vergleich des Her-2/*neu* Gens mit der Zentromerregion des Chromosom 17. Zeigte sich eine Vermehrung beider Signale auf gleichem Niveau, so konnte man von einer Polysomie ausgehen. Diese können wir für unsere zwei schwach amplifizierten Fälle ohne entsprechendes immunhistochemisches Korrelat somit definitiv ausschließen.

Im Gegensatz zu dem bislang Dargestellten hätte nach unserer Analyse eine andere Patientin aufgrund des immunhistochemischen Ergebnisses eine Therapie mit dem Antikörper erhalten ohne eine Genvermehrung zu zeigen, da sie im HercepTest®

ein 3+ Ergebnis, in der FISH jedoch keine Veränderung zeigte. Auch hierbei handelte es sich um ein seröses Karzinom (G3, FIGO III, Material aus dem Jahr 1988). Hierfür existieren mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Das Alter der Proben von teils über 15 Jahren ist als Störfaktor unwahrscheinlich, da Camp et al. (2000) darstellten, dass fixiertes und in Paraffin eingebettetes Archivmaterial auch nach über 60 Jahren seine Oberflächenmerkmale für die untersuchten Hormonrezeptoren, wie auch für Her-2/*neu* behält. Weiterhin kann es zu einer veränderten Transkription des Gens durch veränderte Promotorenaktivität gekommen sein, so dass sich beispielsweise ein erhöhter mRNA-Spiegel bei normalem DNA-Niveau nachweisen lassen könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre ein verminderter Abbau des Membranrezeptors, so dass sich dieser in der Zellmembran anreichert. Ähnliche Fälle schilderten Press et al. (2002) sowohl bei Mammakarzinomen, als auch bei Ovarialkarzinomen in einer deutlich höheren Rate (12%). Diese Fälle zeigten eine Überexpression ohne Veränderung auf genetischer Ebene. Die Autoren diskutierten als Ursache Veränderungen in der Transkriptions- bzw. Translationsebene. Entsprechende Fälle beschrieben auch Jacobs et al. (1999a), wobei von 67 in der FISH nicht amplifizierten Mammakarzinomen drei eine Überexpression in der IHC zeigten.

Ein anderer Erklärungsansatz wird in der Literatur beschrieben. Dabei zeigt der von uns verwendete immunhistochemische HercepTest® eine relativ hohe Rate an falsch positiven Ergebnissen (Hanna, 2001). In dieser Arbeit wird der HercepTest® im Vergleich zu anderen immunhistochemischen Tests zum Nachweis von Her-2/*neu* (CB 11 und 4D5) als zu sensitiv bezeichnet. Allerdings ist derzeit keine Studie bekannt, die die Ergebnisse verschiedener immunhistochemischer Kits mit dem klinischen Verlauf korreliert hat und dadurch eine Aussage über die jeweilige tatsächliche Aussagekraft des Tests bezüglich der Prognose bzw. des Ansprechens auf eine Herceptin®-Therapie machen könnte.

Die dennoch hohe Zuverlässigkeit der Immunhistochemie wurde dadurch unterstrichen, dass alle Monosomien (9/9), bzw. Deletionen (2/2) in der Immunhistologie negativ bewertet wurden, da diese Genveränderungen nicht mit einer Vermehrung des Rezeptors auf der Zelloberfläche einhergingen.

Interessant sind weitere 7 Fälle, die in der Immunhistochemie als überexprimiert mit 2+ bzw. 3+ bewertet wurden. Diese Fälle entsprechen sechs Polysomien und einer Trisomie. Diese Polysomien, die vornehmlich in der Gruppe der Müller'schen

Mischtumoren vorkamen führten also ebenfalls zu einem positiven Ergebnis in der Immunhistochemie. Es bleibt dabei unklar weshalb von insgesamt 31 Polysomien nur sechs zu einem positiven HercepTest® führten. In der Literatur fanden sich hierzu keine weiteren Daten

Zu diskutieren ist, ob diese Fälle zu den „echten“ Amplifikationen hinzugezählt werden müssen. In der Klinik stellt die Diagnose einer Polysomie des *Her-2/neu* Gens eine Therapieindikation dar. Möglicherweise ist so das Ergebnis zahlreicher Studien zu erklären, die eine Überexpression des *Her-2/neu* Rezeptors in einer höheren Frequenz erbrachten, als es in unserer Arbeit der Fall war.

Eine bereits erwähnte Studie (Fajac et al., 1995) hatte einen ähnlichen Versuchsaufbau wie die vorliegende Arbeit. Dabei wurde an 65 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen sowohl das Gen- wie auch der Rezeptorlevel untersucht, um die Abhängigkeit der Ergebnisse voneinander, bzw. den Zusammenhang miteinander zu prüfen. Im Gegensatz zur FISH nutzte diese Studie den Southern blot für den Nachweis der *Her-2/neu* spezifischen DNA, anstelle des HercepTests® den Vorgängertest der Firma DAKO. Dabei wurde keine Übereinstimmung zwischen beiden Untersuchungen gefunden. Vor dem Hintergrund der Daten aus vergleichenden Mammakarzinomstudien und der offenbaren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Ovarialkarzinom erstaunt diese Diskrepanz. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der bereits angedeuteten Störanfälligkeit beider Methoden, besonders des Southern blot. Die Spezifität des Antikörpers der Firma DAKO wurde zudem in den letzten Jahren bis zur Kommerzialisierung als HercepTest® stetig verbessert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die FISH an Schnitten von ca. 2 µm durchgeführt. Standard in der FISH-Diagnostik an Tumoren der Mamma ist eine Schnittdicke von 3-4 µm. Die geringere Dicke wurde gewählt, nachdem es bei der gewöhnlichen Schnittdicke bei dem hohen Zellreichtum der Ovarialkarzinome häufig zu Kernüberlappungen kam, die eine Auswertung unmöglich machten. Bei einem durchschnittlichen Kerndurchmesser von 10-15 µm ist es wahrscheinlich, dass in einem gewissen Prozentsatz Kernanschnitte ausgewertet werden. Je dünner der Schnitt, umso höher die Anzahl dieser unvollständigen Kerne.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Frequenz von *Her-2/neu* Genamplifikationen liegen mit < 10% Amplifikationsnachweis im Vergleich zu

anderen Studien zu demselben Thema im unteren Bereich (Slamon et al., 1989; Rubin et al., 1992 und 1994; Hellström et al., 2001). Eine mögliche Erklärung könnte die Schnittdicke von 2 µm sein, die zu falsch negativen Ergebnissen der FISH geführt haben könnte. Andere Studien beschreiben Schnittdicken von 4-7 µm (Afify et al., 1999; Lebeau et al., 2001). Dieser Erklärung widersprechen jedoch eindeutig die Ergebnisse der Immunhistochemie.

In unserer immunhistologischen Untersuchung wurde die Intensität der membranständigen Farbreaktion beurteilt. Diese Technik wird routinemäßig an Schnitten von 1-2 µm durchgeführt. Unterstellt man nun eine falsch negative FISH, so würde man eine Diskrepanz zwischen FISH und Immunhistochemie im Sinne von FISH negativ / Immunhistochemie positiv (3+) erwarten. Dies ist aber nur in drei von 247 Stansen der Fall gewesen, wobei zudem zwei dieser drei Fälle eine Polysomie aufweisen. Somit scheint die Schnittdicke in der FISH keinen entscheidenden Einfluss auf die Häufigkeit der nachgewiesenen Amplifikationen zu haben.

Der Nachweis des Her-2/*neu* Rezeptors mittels Immunhistochemie hat eindeutige Vorteile gegenüber der FISH. Diese Methode ist kostengünstig und wenig zeitaufwendig. Die Anfertigung wie auch die Auswertung der Präparate ist auch in kleineren Instituten mit wenig Aufwand durchführbar. Die Beurteilung erfolgt an einem normalen Lichtmikroskop. Problematisch war in der Vergangenheit das Angebot von über 30 kommerziellen Nachweistests und die teils fehlende Standardisierung und somit eine mangelnde Vergleichbarkeit der einzelnen Tests. Dabei unterschieden sich diese Kits zum einen aufgrund der unterschiedlichen Klonalität des Antikörpers (Mono- / Poly-), zum anderen in der nachgewiesenen Zielstruktur des Her-2/*neu*-Rezeptors (intra – oder extrazelluläre Domänen etc.). Ein zusätzliches Problem ergibt sich aus unterschiedlichen Fixationslösungen, die Einfluss auf die Qualität und Testergebnisse der einzelnen Tests haben können. (Penault-Llorca et al., 1994). Vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Antikörpern erbrachte noch vor 10 Jahren eine hohe Varianz (Testsensitivität 6-82 %) in den Ergebnissen (Press et al., 1994). Mittlerweile haben sich einige wenige Testkits (u.a. Ventana CB11, DAKO HercepTest) auf dem Markt etabliert, für die jeweils klare Auswertungskriterien gelten. Die angebotenen Test-Kits unterscheiden sich jedoch nach wie vor im Vergleich mit der FISH-Untersuchung in ihrer Sensitivität (88,9-96,6%) (Tubbs et al., 2001; Press et al.,

2002). Auf hohem Niveau treten andere Auswertungsprobleme in den Vordergrund. Die Semiquantitativität der Auswertung macht diesen Test nach wie vor abhängig von der Erfahrung des Pathologen. Die Bewertung nach dem HercepTest®-Scoring System ist in großen Zentren etabliert und zeigt, abhängig von der jeweiligen Studie, eine unterschiedlich gute Übereinstimmung mit der FISH für die Ergebnisse 0/1+ und 3+ der Immunhistologie (u.a. Jacobs et al., 2000; Lebeau et al., 2001; Press et al., 2002, Bilous et al., 2003). In Instituten, die nur wenige Fälle pro Jahr beurteilen, werden überdurchschnittlich viele „falsch“ positive Ergebnissen diagnostiziert, die in einer unabhängigen immunhistologischen Zweituntersuchung nicht reproduzierbar sind (Ellis et al., 2004). Potentielle Fehlerquelle ist die Einbeziehung unspezifischer zytoplasmatischer oder nukleärer Färbereaktionen in die Score-Beurteilung. Studien belegen jedoch, dass ausschließlich die membranöse Anfärbung der Tumorzelle in den Hercep-Score einzugehen hat. Ergebnisse, die anhand dieser strengen Kriterien gewonnen wurden, korrelieren eng mit dem klinischen Ansprechen auf die Herceptin® Therapie (Jacobs et al, 1999b; Hanna, 2001). Aus diesem Grund ist eine regelmäßige Validierung und gleichzeitige Teilnahme an Ringversuchen z.B. durch repräsentative Tissue Microarrays, notwendig. Entsprechende Qualitätskontrollen wurden bereits begonnen (Kay et al., 2004) und werden auch in Deutschland durchgeführt (Rüdiger et al., 2003).

Mehrfach wurde bewiesen, dass beim Mammakarzinom besonders die HercepTest®-Ergebnisse 0/1+ = negativ und 3+ = positiv mit der Prognose und der Ansprechrate auf Trastuzumab korrelieren (Lebeau et al., 2001; Vogel et al, 2001). Es ist evident, dass eine Untersuchung, die das direkte Zielprotein einer Antikörpertherapie in seiner Expression bewertet, der optimale Test für eine Aussage über die Therapieindikation und das Ansprechen ist. Problematisch sind die Tumoren mit dem Ergebnis 2+, also einer moderaten Färbereaktion entlang der Zellmembran. Diese Fälle müssen zusätzlich mit Hilfe der FISH untersucht werden, da nach dem derzeitigen Wissensstand nur die Patientinnen von der Herceptin® Therapie profitieren, die eine entsprechende Veränderung auf Genebene aufweisen. Ein bereits erwähntes Problem im Umgang mit der Immunhistochemie ist die Störanfälligkeit der Untersuchung. Eine hohe Standardisierung der Fixation, der Testdurchführung sowie der Auswertung ist notwendig.

Ebenso wie die Immunhistochemie besitzt auch die FISH Vor- und Nachteile. Sie stellt hohe Anforderung an Personal und Technik. Die Anfertigung der Präparate ist aufwendig, zeitintensiv und störanfällig, ebenso die Auswertung. Man benötigt zudem ein spezielles Fluoreszenzmikroskop. Der Kostenaufwand ist dementsprechend erheblich höher. Aufgrund der zuvor dargelegten guten Übereinstimmung der Immunhistochemie und der FISH in den nicht bzw. in den Fällen mit starker Expression ist der selektive Einsatz der FISH bei Tumoren mit einem Hercep Score von 2+ empfehlenswert. Die so kombinierte Diagnostik aus Immunhistochemie und FISH lässt sich auch durch die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit gut begründen. Der Einsatz der FISH nur in ausgewählten Fällen erscheint ökonomisch sinnvoll, wenn man bedenkt, dass jede FISH-Analyse einen etwa doppelt so hohen Kostenaufwand und einen unvergleichbar höheren Zeitaufwand darstellt wie ein HercepTest®.

Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der Her-2/*neu* Genamplifikation und der Her-2/*neu* Rezeptorüberexpression in verschiedenen Tumoren des Ovars. Untersucht wurden diese Veränderungen mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und der Immunhistochemie. Die Ergebnisse bei den Ovarialkarzinomen exklusive Borderline-Tumoren lagen mit 6,8% (10/146) Amplifikation in der FISH und 6,7% (11/163) Überexpression in der Immunhistochemie im Vergleich zu Literaturdaten im unteren Bereich. Es fand sich kein Zusammenhang mit einem klinischen oder pathologischen Parameter (Tumorstadium, Tumorgrad, Tumortyp, Überleben). Die Literaturdaten zu diesen Fragestellungen sind kontrovers. Aufgrund der Tatsache, dass auch ein einzelner ovarieller Borderline-Tumor eine Genamplifikation aufwies, ist offensichtlich, dass diese Veränderung kein Phänomen darstellt, das vor allem für aggressive Tumoren oder fortgeschrittener Tumorstadien charakteristisch ist. Her-2/*neu* scheint somit für das Ovarialkarzinom sowohl prognostisch wie therapeutisch eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die malignen Müller'schen Mischtumoren zeigten in Bezug auf die untersuchten Veränderungen ein überaus heterogenes Bild. Dabei ergab sich keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp. Die geringe Frequenz echter Genamplifikationen macht eine prognostische Relevanz dieser Veränderung auch in dieser Tumorgruppe unwahrscheinlich. Granulosazelltumoren zeigten keinerlei Auffälligkeiten des Her-2/*neu* Gens und Rezeptors, somit scheidet diese Veränderung zur früheren Abschätzung des Wachstumsverhaltens aus.

Die Ergebnisse von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie zeigten zueinander eine hohe Übereinstimmung ($p < 0,005$). Somit unterstreicht die vorliegende Arbeit die bislang veröffentlichten Ergebnisse zum Vergleich von HercepTest® und FISH. Daraus lässt sich zugleich schließen, dass sich Her-2/*neu* Genveränderungen in Tumoren des Ovars in gleicher Weise auf den Rezeptorstatus auswirken wie es in Karzinomen der Mamma gezeigt wurde. Zugleich bestätigte sich hierdurch der in der Praxis angewandte Algorithmus zur zuverlässigen Diagnose von Her-2/*neu*-Veränderungen in Mammakarzinomen.

Der Tissue Microarray erwies sich als praktische Methode zu zeiteffektiven Bearbeitung einer großen Anzahl von Geweben im Rahmen von Studienbedingungen.

Literaturverzeichnis:

1. A. Afify, B. Werness, H.F. Mark,
Her-2/neu oncogene amplification in stage I and stage III ovarian papillary
serous carcinoma.
Exp.Mol.Pathol.;66:163-169(1999)
2. Atlas of Interpretation of HercepTest™ Staining der Firma DAKO
3. C. Bargmann, M.-C. Hung, R. Weinberg,
The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein
Nature;316:226-230(1986)
4. J. Baselga
Herceptin® alone or in combination with chemotherapy in the treatment of
HER2-positiv metastatic breast cancer: Pivotal trials
Oncol.;61(suppl2):14-21(2001)
5. R. Bast, C. Boyer, I. Jacobs, F. Xu, S. Wu, J. Wiener, M. Kohler, A. Berchuk
Cell growth regulation in epithelial ovarian cancer
Cancer Suppl.;71(4):1597-1601(1993)
6. C. Benz, G. Scott, J. Scott, R. Johnson, D. Tripathy, E. Coronado, H.
Shepard, C. Osborne
Estrogen-dependent, Tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells
transfected with HER2/neu
Breast.Canc.Res.Treat.;24(2):85-95(1992)
7. A. Berchuck, M. Carney,
Human ovarian cancer of the surface epithelium
Biochem.Pharmacol;54:541-544(1997)
8. A. Berchuck, A. Kamel, R. Whitaker, B. Kerns, G. Olt, R. Kinney, J. T. Soper,
R. Dodge, D.L. Clarke-Pearson, P. Marks, S. McKenzie, S. Yin, R. Bast
Overexpression of HER-2/neu is associated with poor prognosis in advanced
epithelial ovarian cancer
Canc. Research;50:4087-4091(1990)
9. A. Berchuck, G. Rodriguez, R. Kinney, J. Soper, R. Dodge,
D. Clarke-Pearson, R. Bast
Overexpression of HER-2/*neu* in endometrial cancer is associated with
advanced stage disease
Am.J.Obstet.Gynecol.;164(1):15-21(1991)
10. M. Bilous, M. Dowsett, W. Hanna, J. Isola, A. Lebeau, A. Moreno,
F. Penault-Llorca, J. Rüschoff, G. Tomasic, M. Van de Vijver
Current perspectives on HER2 testing: a review of national to guidelines
Mod. Pathol.16(2):173-182(2003)

11. M. Bookman
Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art
Int.J.Gynecol.Cancer;15(Suppl.3):212-220(2005)
12. M. Bookman, K. Darcy, D. Clarke-Pearson, R. Boothby, I. Horowitz
Evaluation of monoclonal humanized anti HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of her2neu: a phase II trial of the gynecologic group
J.Clin.Oncol.;21(2):,283-290(2003)
13. E. Brown, M. Stewart, T. Rye, A. Al-Nafussi, A. Williams, M. Bradburn, J. Smyth, H. Gabra
Carcinosarcoma of the ovary
Cancer;100(10):2148-2153(2004)
14. J.-L. Brun, A. Feyler, G. Chêne, J. Saurel, G. Brun, C. Hockè
Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer
Gynecol.Oncol. ;78 :21-27(2000)
15. A. Burges, J.F.H. Gauwerky, E.M. Grischke, S. Rutke, M. Schelling, Ch. Wolf
Präoperative Diagnostik
Manual, Maligne Ovarialtumoren, Tumorzentrum München:17-18(2004)
16. R. Camp, L. Charette, D. Rimm
Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma
Lab.Invest.;80(12):1943-1949(2000)
17. R. Camp, M. Dolled-Filhart, B. King, D. Rimm
Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows that both high and normal levels of HER2 expression are associated with poor survival
Canc.Res.;63:1445-1448(2003)
18. M. Cobleigh, C. Vogel, D. Tripathy, N. Robert, S. Scholl, L. Fehrenbacher, J. Wolter, V. Paton, S. Shak, G. Lieberman, D. Slamon,
Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpression metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease
J.Clin.Oncol.;17(9):2639-2648(1999)
19. L. Coussens, T. Yang-Feng, Y.-C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. Seeburg, T. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, A. Levinson, A. Ullrich
Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene
Science, 230;1132-1139(1985)
20. J. Diebold, P. Dettmar, N. Harbeck, C. Höß, E. Oberlechner, B. Schmalfeldt, M. Untch
Borderline-Tumoren
Manual, Maligne Ovarialtumoren, Tumorzentrum München:66-68(2004)

21. I. Dimova, B. Zaharieva, S. Raitcheva, R. Dimitrov, N. Doganov, D. Toncheva
Tissue microarray analysis of EGFR and erbB2 copy number changes in ovarian tumors
Int.J.Gynecol.Canc.;16:145-151(2006)
22. I. Ellis, J. Bartlett, M. Dowsett, S. Humphreys, B. Jasani, K. Miller, S.Pinder, A. Rhodes, R. Walker
Update recommendations for HER2 testing in the UK
J.Clin.Pathol.;57:233-237(2004)
23. G. Eltabbakh, J. Belinson, A. Kennedy, C. Biscotti, G. Casey, R. Tubbs, L. Blumenson
P53 overexpression is not an independent prognostic factor for patients with primary ovarian epithelial cancer
Cancer;80(5): 892-898(1997)
24. J. Engel, G. Hölscher, G. Schubert-Fritschle
Epidemiologie
Manual, Maligne Ovarialtumoren, Tumorzentrum München:1-11(2004)
25. A. Fajac, J. Benard, C. Lhomme, A. Rey, P. Duvillard, F. Rochard, J.-F. Bernaudin, G. Riou
c-*erbB2* gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: Evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis
Int.J.Canc.;64:146-151(1995)
26. J. Geisler, H. Geisler
Tumor markers and molecular biological markers in gynaecologic malignancies
Obstet.Gynecol;13:31-39(2001)
27. B. Goff, K. Shy, B. Greer, H. Muntz, M. Skelly, A. Gown
Overexpression and relationship of Her-2/neu, epidermal growth factor receptor, p53, Ki-67, and tumor necrosis factor alpha in epithelial ovarian cancer. (abstr.)
Eur.J.Gynaecol.Oncol.;17(6):487-492(1996)
28. B. Gusterson, R. Gelber, A. Goldhirsch, K. Price, J. Säve-Söderborgh, R. Anbazhagan, J. Styles, C.-M. Rudenstam, R. Reed, F. Martinez-Tello, A. Tiltman, J. Torhorst, P. Grigolato, R. Bettelheim, A. Neville, K. Bürki, M. Castiglione, J. Collins, J. Lindtner, H.-J. Senn,
Prognostic importance of c-*erbB-2* expression in breast cancer
J. Clin. Onco.;10(7):1049-1056(1992)
29. K. Gutschow, P. Dettmar, J. Diebold, P. Hillemanns, E. Keller, E. Oberlechner, B. Schmalfeldt
Seltene Formen maligner Ovarialtumoren
Manual, Maligne Ovarialtumoren, Tumorzentrum München:69-76(2004)

30. W. Hanna
Testing for HER2 status
Oncol;61(suppl 2):22-30(2001)
31. M. Harris, L. Delap, P. Sengupta, P. Wilkinson, R. Welch, R. Swindell, J. Shanks, G. Wilson, R. Slade K. Reynolds, G. Jayson
Carcinosarcoma of the ovary
Br.J.Canc.;88:654-657(2003)
32. I. Hellström, G. Goodman, J. Pullman, Y. Yang, K. E. Hellström
Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas
Canc.Res.;61:2420-2423(2001)
33. J. Hengstler, J. Lange, A. Kett, N. Dornhöfer, R. Meinert, M. Arand, P. Knapstein, R. Becker, F. Oesch, B. Tanner
Contribution of *c-erbB-2* and topoisomerase IIa to chemoresistance in ovarian cancer
Canc.Res.;59:3206-3214;(1999)
34. M. Hoang, A. Sahin, N. Ordóñez, N. Sneige
HER-2/*neu* gene amplification compared with HER-2/*neu* protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma
Am.J.Clin.Pathol.;113:852-859(2000)
35. E. Høgdall, L. Christensen, S. Kjaer, J. Blaakaer, J. Bock, E. Glud, B. Nørgaard-Pedersen, C. Høgdall
Distribution of Her-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma
Cancer;98:66-73(2003)
36. C. Hough, C. Sherman-Baust, E. Pizer, F.j. Montz, D. Im, N. Rosensheim, K. Cho, G. Riggins, P. Morin
Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer
Canc.Res.;60:6281-6287(2000)
37. F. Hsu, T. Nielsen, A. Alkushi, B. Dupuis, D. Huntsman, C. Liu, M. van de Rijn, B. Gilks
Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry
Mod.Pathol.;15(12):1374-1380(2002)
38. R. Hudziak, J. Schlessinger, A. Ullrich
Increased expression of the putative growth factor receptor p185 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells
Proc. Natl. Acad. Sci ;84:7159-7163(1987)
39. T. Jacobs, A. Gown, H. Yaziji, M. Barnes, S. Schnitt
Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for evaluation of *HER-2/neu* in breast cancer
J.Clin.Oncol.17(7):1974-1982(1999a)

40. T. Jacobs, A. Gown, H. Yaziji, M. Barnes, S. Schnitt
Specificity of HercepTest in determining *HER-2/neu* status of breast cancers using the united states food and drug administration-approved scoring system
J.Clin.Oncol.;17(7):1983-1987(1999b)
41. T. Jacobs, A. Gown, H. Yaziji, M. Barnes, S. Schnitt,
HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement
Am.J.Clin.Pathol.;113(2):251-258(2000)
42. R. Jimenez, M. Hussain, F. Bianco, U. Vaishampayan, P. Tabazcka, W. Sakr. E. Pontes, D. Wood, D. Grignon
HER-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis of primary and metastatic tumors
Clin.Canc.Res.;7(8):2440-2447(2001)
43. R. Jimenez, T. Wallis, P. Tabaszka, D. Visscher
Determination of *HER-2/neu* status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation
Mod. Pathol.;13(1),37-45(2000)
44. Z. Jin, S. Ogata, G. Tanemura, Y. Katayama, M. Fukase, M. Yajima, T. Motoyama
Carcinosarcomas (malignant mullerian mixed tumors) of the uterus and ovary: a genetic study with special reference to histogenesis
Int.J.Gynecol.Pathol.;22:368-373(2003)
45. E. Kay, A. O`Grady, J. Morgan, S. Wozniak, B. Jasani
Use of tissue microarray for interlaboratory validation of HER2 immunocytochemical and FISH testing
J.Clin.Pathol.;57:1140-1144(2004)
46. J. Kern, R. Slebos, B. Top, S. Rodenhuis, D. Lager, R. Robinson, D. Weiner, D. Schwartz
C-erbB-2 expression and codon 12 *K-ras* mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas
J.Clin.Invest.;93:516-520(1994)
47. C. King, M. Kraus, S. Aaronson
Amplification of a novel v.erbB-related gene in a human mammary carcinoma
Science;229(4717):974-976(1985)
48. H. Kluger, K. DiVito, A. Berger, R. Halaban, S. Ariyan, R. Camp, D. Rimm
Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma – a large cohort tissue microarray study
Melanoma Res.;14(3):207-210(2004)

-
49. J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Bärland, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. Mihatsch, G. Sauter, O.-P. Kallioniemi
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens
Nat. Medicine;4(7):844-847(1998)
 50. R. Kurman, J.-D. Seidmann, I.-M. Shih,
Serous borderline tumours of the ovary
Histopathol.;47:310-318(2005)
 51. A. Lebeau, D. Deimling, C. Kaltz, A. Sendelhofert, A. Iff, B. Luthardt,
M. Untch, U. Löhns
HER-2/*neu* analysis in archival tissue samples of human breast cancer:
Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation
J.Clin.Oncol.;19(2):354-363(2001)
 52. K.R. Lee, F.A. Tavassoli, J. Prat, M. Dietel, D.J. Gersell, A.I. Karseladze, S.
Hauptmann, J. Rutgers, P. Russell, C.H. Buckley, P. Pisani, P. Schwartz,
D.E. Goldgar, E. Silva, R. Caduff, R.A. Kubik-Huch
Surface epithelial-stromal tumours
WHO Classification of tumours;117-144(2004)
 53. F. Mayall, K. Ruddy, F. Campbell
P53 immunostaining suggests that uterine carcinosarcomas are monoclonal
Histopathol.;24:21-214(1994)
 54. A. Makar, R. Holm, G. Kristensen, J. Nesland, C. Tropè
The expression of c-erbB-2 (Her-2/*neu*) oncogene in invasive ovarian
malignancies
Int.J.Gynecol.Canc.;4:194-199(1994)
 55. H.F. Mark, S. Brown, C.-I. Sun, M. Samy, A. Afify
Fluorescent in situ hybridization detection of HER-2/*neu* gene amplification in
rhabdomyosarcoma
Pathobiol.;66:59-63(1998)
 56. H.F. Mark, B. Aswad, N. Bassily, W. Taylor, S. Brown, C.-L. Sun, M. Samy,
K. Zolnierz, E. Wong, K. Bland, P. Hsu
HER-2/*neu* gene amplification in stage I-IV breast cancer by fluorescent in situ
hybridization (abstr.)
Genet.Med.;1(3):98-193(1999)
 57. D. Mayr, J. Diebold
Grading of Ovarian Carcinomas
Int.J.Gynecol.Path.;19:348-353(2000)
 58. D. Mayr, C. Kaltz-Wittmer, S. Arbogast, G. Amann, D. Aust, J. Diebold
Characteristic pattern of genetic aberrations in ovarian granulosa cell tumors
Mod.Pathol.;15(9):951-957(2001)

-
59. H. Meden, W. Kuhn,
Overexpression of the oncogene *cerbB-2* (Her2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor
Eur.J.Obstet.Gynecol.;71:173-179(1997)
 60. M. Medl, P. Sevelde, K. Cterwenka, K. Dobianer, H. Hanak, C. Hruza, M. Klein, S. Leopolder, S. Müllauer-Ertl, A. Rosen, H. Salzer, N. Vavra, J. Spona
DNA amplification of Her-2/neu and INT-2 oncogenes in epithelial ovarian cancer
Gynecol.Oncol.;59:321-326(1995)
 61. M. Milanes-Yearsley, E. Hammond, T. Pajak, J. Cooper, C. Chang, T. Griffin, D. Nelson, G. Laramore, M. Pilepich
Tissue micro-array: A cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups
Mod.Pathol.;15(12):1366-1373(2002)
 62. H. Moch, J. Kononen, O.-P. Kallioniemi, G. Sauter
Tissue microarray: What will they bring to molecular and anatomic pathology?
Adv.Anat.Pathol.;8(1):14-20(2001)
 63. H. Moch, P. Schraml, L. Bubendorf, M. Mirlacher, J. Kononen, T. Gasser, M. Mihatsch, O.-P. Kallioniemi, G. Sauter
High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA Microarray screening in renal cell carcinoma
Am.J.Pathol.;154(4):981-986(1999)
 64. R. Navarini, R. Pineda
Malignant mixed müllerian tumors of the ovary
Curr. Opin.Obstet.Gynecol.;18:20-23(2006)
 65. A. O`Grady, C. Flahavan, E. Kay, H. Barrett, M. Leader
HER-2 analysis in tissue microarrays of archival human breast cancer
Immunohistoche.Molecul.Morphol.;11(2):177-182(2003)
 66. S. Paik, J. Bryant, E. Tan-Chiu, E. Romond, W. Hiller, K. Park, A. Brown, G. Yothers, S. Anderson, R. Smith, D.L. Wickerham, N. Wolmark
Real-world performance of HER2 testing – national surgical adjuvant breast and bowel project experience
J.Nat.Canc.Inst.;94(11):852-854(2002)
 67. PathVysion™ Her-2 DNA
Probekit Anleitung zur Präparatherstellung und Auswertung
 68. G. Pauletti, S. Dandekar, H. Rong, L. Ramos, H. Peng, R. Sheshadri, D. Slamon
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. Onco.;18(21):3651-3664(2000)

-
69. G. Pauletti, W. Godolphin, M. Press, D. Slamon
Detection and quantitation of HER-2/*neu* gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence *in situ* hybridization
Oncogene; 13(1):63-72(1996)
 70. M. Pegram, G. Pauletti, D. Slamon
HER-2/*neu* as a predictive marker of response to breast cancer therapy
Breast cancer research and treatment, 52,65-77(1998)
 71. M. Pegram, S. Hsu, G. Lewis, R. Pietras, M. Beryt, M. Sliwkowski, D. Coombs, D. Baly, F. Kabbinavar, D. Slamon
Inhibitory effects of combinations of Her-2/*neu* antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers
Oncogene;18:2241-2251(1999)
 72. F. Penault-LLorca, J. Adelaide, G. Houvenaeghel, J. Hassoun, D. Birnbaum, J. Jacquemier
Optimization of the immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation
J.Pathol.;173:65-75(1994)
 73. M. Piccart, C. Lohrisch, a. Di Leo, D. Larsimont
The predictive value of HER2 in breast cancer
Oncol.;61(suppl2):73-82(2001)
 74. R.J. Pietras, B.M. Fendly, V.R. Chazin, M.D. Pegram, S.B. Howell, D.J. Slamon
Antibody to HER-2/*neu* receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells
Oncogene; 9,1829-1838 (1994)
 75. M. Press, L. Jones, W. Godolphin, C. Edwards, D. Slamon
HER-2/*neu* oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancer
Effects of therapy on biology and kinetics of the residual tumor, Part A: Pre-clinical aspects, 209-221 (1990)
 76. M. Press, M. Pike, G. Hung, J. Zhou, Y. Ma, J. George, J. Dietz-Band, W. James, D. Slamon, J. Batsakis, A. El-Naggar
Amplification and overexpression of Her-2/*neu* in carcinomas of the salivary gland: Correlation with poor prognosis
Canc.Res.;54:5675-5682(1994a)
 77. M. Press, G. Hung, W. Godolphin, D. Slamon
Sensitivity of Her-2/*neu* antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression
Cancer res.;54:2771-2777(1994b)

-
78. M. Press, L. Bernstein, P. Thomas, L. Meisner, J.-Y. Zhou, Y. Ma, G. Hung, R. Robinson, C. Harris, A. El-Naggar, D. Slamon, R. Phillips, J. Ross, S. Wolman, K. Flom
HER-2/*neu* gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast cancer
J.Clin. Onco.;15(8):2894-2904(1997)
 79. M. Press, D. Slamon, K. Flom, J. Park, J.-Y. Zhou, L. Bernstein
Evaluation of HER-2/*neu* gene amplification and overexpression: Comparison of frequent used assay methods in a molecular characterized cohort of breast cancer specimens
J.Clin. Oncol.;20:3095-3105(2002)
 80. D. Reese, D. Slamon
HER-2/*neu* signal transduction in human breast and ovarian cancer
Stem;15(1):1-8,(1997)
 81. P. Roche, V. Suman, R. Jenkins, N. Davidson, S. Martino, P. Kaufman, F. Addo, B. Murphy, J. Ingle, E. Perez
Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831
J.Nat.Canc.Inst.;94(11):855-857(2002)
 82. S. Rubin, C. Finstad, G. Wong, L. Almadrones, M. Plante, K. Lloyd
Prognostic significance of HER-2/*neu* expression in advanced epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis
Am.J.Obstet.Gynecol.;168(1):162-169(1992)
 83. S. Rubin, C. Finstad, M. Federici, L. Scheiner, K. Lloyd, W. Hoskins
Prevalence and significance of HER-2/*neu* expression in early epithelial ovarian cancer
Cancer;73:1456-1459 (1994)
 84. T. Rüdiger, H. Höfler, H.-H. Kreipe, H. Nizze, U. Pfeifer, H. Stein, F.E. Dallenbach, H.-P. Fischer, M. Mengel, R. von Wasielewski, H.K. Müller-Hermelink
Ringversuch 2000 „Immunhistochemie“ der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Berufsverbandes der Deutschen Pathologen
Pathologe;24:70-78(2003)
 85. S. Schnitt, T. Jacobs
Current status of HER-2 testing
Am. J. Clin.Pathol.;116:806-810(2001)
 86. M. Schoenberg Fejzo, D. Slamon,
Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA and proteins
Am.J.Pathol.;159(5):1645-1650(2001)

-
87. P. Schraml, J. Kononen, L. Bubendorf, H. Moch, H. Bissig, A. Nocito, M. Mihatsch, O.-P. Kallioniemi, G. Sauter
Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types
Clin.Canc.Research.;5:1966-1975(1999)
 88. M. Schuijjer, E. Berns,
TP53 and ovarian cancer
Hum. Mutation; 21,285-291(2003)
 89. M. Schummer, W.-L. Ng, R. Bumgarner, P. Nelson, B. Schummer, D. Bednarski, L. Hassell, R.L. Baldwin, B. Karlan, L. Hood
Comparative hybridization of an array of 21 500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas
Gene;238:375-385(1999)
 90. B. Scoccia, Y. Lee, C. Niederberger, J. Ilekis
Expression of the ErbB family of receptors in ovarian cancer
J.Soc.Gynecol.Invest.;5(3):161-165(1998)
 91. R. Scully
Pathology of ovarian cancer precursors (abstr.)
J.Cell.Biochem.Suppl.;23:208-218(1995)
 92. J. Seidman, R. Kurman,
Ovarian serous borderline tumors: A critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators
Hum.Path.;31(5):539-549(2000)
 93. R. Seshadri, F.A. Firgaira, D.J. Horsfall, K. McCaul, V. Setlur, P. Kitchen
Clinical significance of HER-2/*neu* oncogene amplification in primary breast cancer
J.Clin.Oncol.;11(10):1936-1942(1993)
 94. F. Sharp, A.D. Blackett, J.S. Berek, R.C. Bast
Conclusions and recommendations from the Helene Harris Memorial Trust Sixth Biennial International Forum on Ovarian Cancer, may 10-14, 1997, Los Angeles, California, USA
Int.J.Gynecol.Cancer;7:416-424(1997)
 95. I.-M. Shih, R. Kurman
Ovarian tumorigenesis – A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis
Am.J.Pathol.;164(5):1511-1518(2004)
 96. C. Shih, L.C. Padhy, M. Murray, R.A. Weinberg
Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts
Nature; 290(5803):261-264(1981)

-
97. N. Sieben, P. Macropoulos, G. Roemen, S. Loklman-Uljee, G. Fleuren, R. Houmadi, T. Diss, B. Warren, M. Al Adnani, A. de Goeij, T. Krausz, A. Flangan
In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours
J.Pathol;202:336-340(2004)
 98. S. Silverberg
Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal
Int. J. Gynecol Pathol;19:7-15(2000)
 99. G. Singer, R. Kurman, H.-W. Chang, S. Cho, I.-M. Shih
Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma
Am.J.Pathol.;160(4):1223-1228(2002)
 100. G. Singer, R. Oldt, Y. Cohen, B. Wang, D. Sidransky, R. Kurman, I.-M. Shih
Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma
J.Nat.Canc.Inst.;95(6):484-486(2003)
 101. G. Singer, R. Stöhr, L. Cope, R. Dehari, A. Hauptmann, D.-F. Cao, T.-L. Wang, R. Kurman, I.-M. Shih
Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis
Am.J.Surg.Pathol.;29(2):218-224(2005)
 102. R. Simon, J. Richter, U. Wagner, A. Fijan, J. Bruderer, U. Schmid, D. Ackermann, R. Maurer, G. Alund, H. Knönagel, M. Rist, K. Wilber, M. Anabritate, F. Hering, T. Hardmeier, A. Schönenberger, R. Flury, P. Jäger, J.-L. Fehr, P. Schraml, H. Moch, M. Mihatsch, T. Gasser, G. Sauter
High-throughput tissue Microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer
Canc.Res.;61:4514-4519(2001)
 103. I. Skirnisdottir, B. Sorbe, T. Seidal,
The growth factor receptor HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis on early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma
Int.J.Gynecol.Canc.;11:119-129(2001)
 104. D. Slamon, G. Clark, S. Wong, W. Levin, A. Ullrich, W. McGuire
Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu Oncogene
Science;235:177-182(1987)
 105. D. Slamon, W. Godolphin, L. Jones, J. Holt, S. Wong, D. Keith, W. Levin, S. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M. Press
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer
Science;244:707-712(1989)

-
106. D. Slamon, M. Pegram
Rationale for Trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials
Sem.Oncol.;28(suppl.3):13-19(2001)
 107. S.A. Szukala, J. Marks, J. Burchette
Coexpression of p53 by epithelial and stromal elements in carcinosarcoma of the female genital tract: an immunohistochemical study of 19 cases
Int.J.Gynecol.Canc.;9:131-136(1999)
 108. J. Torhorst, Ch. Bucher, J. Kononen, P. Haas, M. Zuber, O. Köchli, F. Mross, H. Dietrich, H. Moch, M. Mihatsch, O.-P. Kallioniemi, G. Sauter
Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints
Am.J.Pathol.;159(6):2249-2256(2001)
 109. R. Tubbs, J.Pettay, P. Roche, M. Stoler, R. Jenkins, T. Grogan
Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positiv do not get the message
J. Clin. Oncol;19(10):2714-2721(2001)
 110. A. Ullrich, J. Schlessinger
Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity
Cell;61:203-212(1990)
 111. E. Verri, P. Guglielmi, M. Puntoni, L. Perdelli, A. Papaia, P. Lorenzi, A. Rubagotti, N. Ragni, F. Boccardo
Her2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: Evaluation of its prevalence an prognostic significance
Oncol.;68:154-161(2005)
 112. A. Villa, F. Parazzini, S. Acerboni, P. Guarnerio, G. Bolis
Survival and prognostic factors of early ovarian cancer
Br.J.Canc.;77(1):123-124(1998)
 113. C. Vogel, M. Cobleigh, D. Tipathy
Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of Her2-overexpressing metastatic breast cancer
J.Clin.Oncol.;20:719-726(2002)
 114. Ch. Wallasch, F.U. Weiß, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing, A. Ullrich
Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling, by heterodimerization with HER3
EMBO J.;14(17):4267-4275(1995)
 115. K. Wang, L. Gan, E. Jeffery, M. Gayle, A. Gown, M. Skelly, P. Nelson, W. Ng, M. Schummer, L. Hood, J. Mulligan
Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray
Gene;229:101-108(1999)

-
116. Y. Yarden
Biology of HER2 and its importance in breast cancer
Oncol.;61(suppl2):1-13(2001)
117. Y. Yonemura, I. Ninomiya, A. Yamaguchi, S. Fushida, H. Kimura, S. Ohoyama, I. Kiyazaki, Y. Endou, M. Tanaka, T. Sasaki
Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker or poor short term prognosis in gastric cancer
Canc.Res.;51:1034-1038(1991)
118. M.R. Zalutsky, F.J. Xu, Y. Yu, C.F. Foulon, X.-G. Zhao, S.K. Slade, D.J. Affleck, R.C. Bast
Radioiodinated antibody targeting of the Her-2/neu oncoprotein: effects of labelling method on cellular processing and tissue distribution
Nucl Med Biol;26:781-790(1999)
119. B. Zhou, M. Hu, S. Miller, Z- Yu. W. Xia, S.-Y. Lin, M;.-C. Hung
Her-2/*neu* blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- κ B pathway
J.Biol.Chem.;275(11):8027-8031(2000)

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immuno absorbent assay
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Grünfilter des Fluoreszenz-Mikroskops)
HCT	HercepTest®
HE	Hämatoxilin-Eosin = Standardfärbung
IHC	Immunhistochemie
LMP	Low malignant potential = Borderline-Tumor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
TMA	Tissue Microarray
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat (Rotfilter des Fluoreszenz-Mikroskops)
UICC	Union Internationale Contre Cancer
WHO	World Health Organisation

Danksagung

An dieser Stelle sei all denjenigen gedankt, die mir diese Arbeit ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. U. Löhns und Herrn Prof. Dr. Th. Kirchner für die Möglichkeit, die Arbeit unter ihrer Institutsleitung zu beginnen bzw. abzuschließen.

Herrn Prof. Dr. J. Diebold für die Überlassung des Themas und insbesondere für Ratschläge und wertvolle Kritiken bei der Abfassung der Arbeit.

Frau Dr. D. Mayr für die hilfreiche Betreuung bei der Planung und Ausarbeitung der Arbeit.

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

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Veronika Lina Kanitz, geb. Frenzel
Geburtsdatum/-ort: 05.08.1977 in München
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Werner Kanitz
Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Klaus Frenzel, Diplom-Kaufmann und
Ehefrau Dr. med. Brigitte, geb. Diehl

Geschwister: Dr. rer. nat. Ulrich Frenzel (35 Jahre, Chemiker) und
Johannes Frenzel (32 Jahre, Rechtsanwalt)

Schulbildung:

1984-1988 Grundschule an der Oselstraße, München
1988-1997 Karls gymnasium München Pasing, Humanistischer Zweig
Leistungskurse: Alt-Griechisch, Biologie
27.06.1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Gesamtnote: 1,6

Hochschulausbildung:

05/1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der Ludwig Maximilians Universität München

03/2000 Physikum, Gesamtnote: 2,0

03/2001 1. Staatsexamen der Humanmedizin, Gesamtnote: 2,0

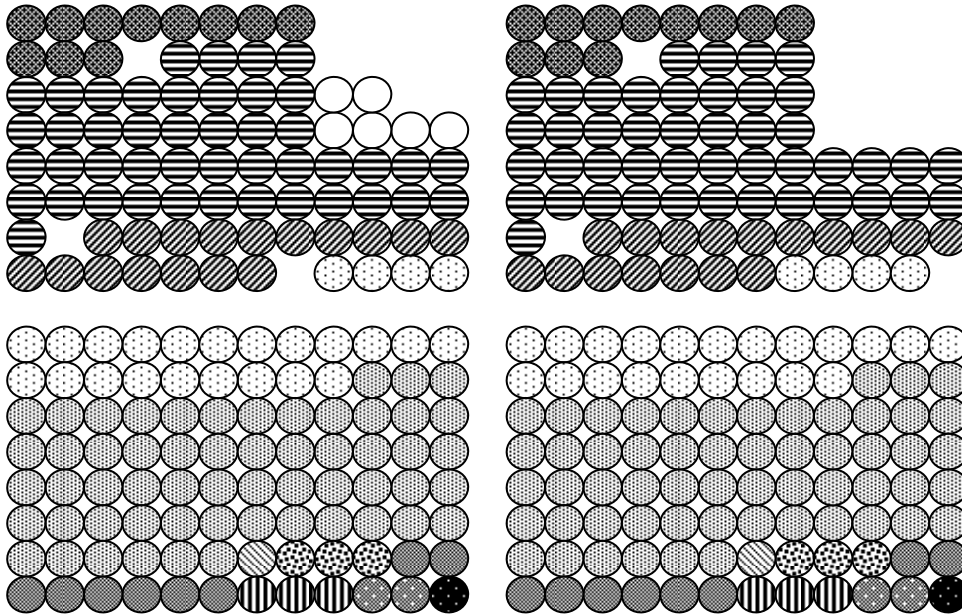
03/2004 2. Staatsexamen der Humanmedizin, Gesamtnote: 2,0

04/2004-03/2005 Praktisches Jahr













02.05.2005 3. Staatsexamen der Humanmedizin,
Gesamtnote: 1,6
Prüfungsfächer: Innere Medizin, Chirurgie, Pathologie, Urologie

Seit 15.06.2005 Wissenschaftliche Angestellte am Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Chefarzt: Prof. Dr. Th. Kirchner)

Vorveröffentlichung: "Her-2/*neu* gene amplification in ovarian tumours:
a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on
tissue microarrays"
D. Mayr, V. Kanitz, G. Amann, J. Engel, A. Burges, U. Löhrs,
J. Diebold
Histopathology;48:149-156(2006)

Anhang 1.Lageplan Block 1

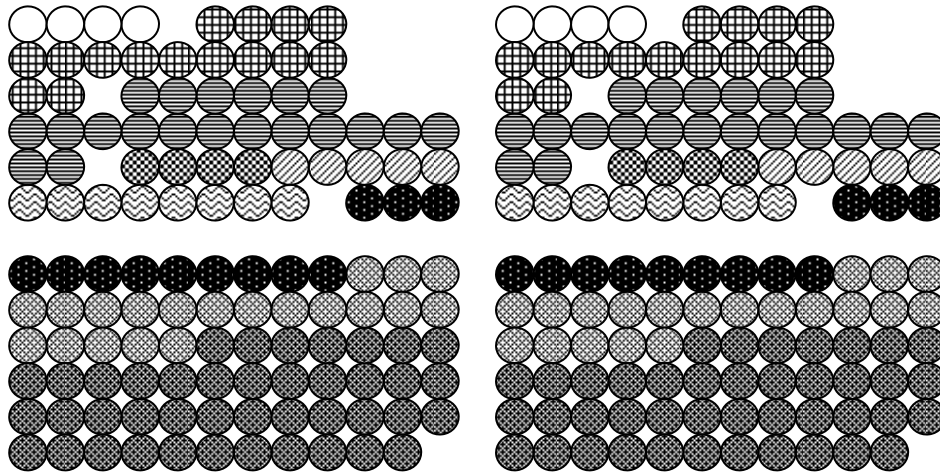
Legende:

 Benigne Tumoren	 Referenzgewebe	 Extra Kollektiv 1	 Extra Kollektiv 2
 Seröse Karzinome, G2	 Seröse Karzinome, G3	 Klarzellige Karzinome, G2	 Klarzellige Karzinome, G3
 Endometrioides Karzinom, G2	 Endometrioides Karzinome, G3	 Muzinöses Karzinom, G2	 Muzinöses Karzinom, G3










Die "Extrakollektive" 1 und 2 enthalten diverse Ovarialkarzinome verschiedener Differenzierungen, Tumorgade und Tumorstadien. An diesen Tumoren wurden institutsintern bereits andere Untersuchungen durchgeführt, daher wurden diese Gewebeproben als Kollektive auf dem Block angeordnet.

Anhang 2.

Lageplan Block 2



Legende:

 Verschiedenes	 Borderline muzinös	 Borderline serös	 Endometrioides Karzinome G1
 Muzinöse Karzinome, G1	 Seröse Karzinome, G1	 Andere Tumoren	 Granulosa-Zelltumoren
 Karzino-Sarkome			