Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-
Innenstadt der Ludwig-Maximillians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

HER2 und Topoisomerase IIα-Expression und Amplifikation des Mamma-Karzinoms – Einfluss auf das Ansprechen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie sowie auf die Präsenz Isolierter Tumorzellen im Knochenmark (ITZ-KM)

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximillians-Universität zu München

vorgelegt von
Anke Kornmeier
aus
Offenburg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Sommer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Schleicher
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Ch. Schindlbeck
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	12.06.2008

1. Einleitung 1

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms 1
1.2 Definition des Mammakarzinoms 5
1.3 Prognosefaktoren 6
1.4 Prädiktive Faktoren 11

2. Zielsetzung 13

3. Material und Methoden 14

3.1 Patientinnen 14
3.2 Immunhistochemische Bestimmung der Topoisomerase IIα Expression/Überexpression 16
3.2.1 Reagentien 16
3.2.2 Immunhistochemisches Färbeverfahren 18
3.3. Immunhistochemische Bestimmung der HER-2/neu Expression/ Überexpression 21
3.3.1 Immunhistochemisches Färbeverfahren 21
3.4 Bestimmung der HER-2/neu und Topoisomerase IIα Gen- Amplifikation mittels Fluoreszens-in-situ-Hybridisierung 23
3.4.1 Reagenzien 23
3.4.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung FISH 25
3.5 Knochenmarkaufbereitung und Immunzytologie mittels APAAP- Methode 27
3.5.1 Reagenzien zur Knochenmarksaufbereitung 27
3.5.2 Knochenmarkaspirate und deren Aufbereitung 28
3.5.3 Reagenzien zur Immunzytologie 29
3.5.4 Immunzytologie mittels APAAP- Methode 31
3.6 Statistische Auswertung 34

4. Ergebnisse 35

4.1 Charakterisierung der Patientinnen 35
4.2 HER-2/neu Gen Amplifikation und HER-2/neu Überexpression 38
4.2.1 HER-2/neu Immunhistochemie 38
4.2.2 HER-2/neu FISH 39
4.2.3 Vergleich der HER-2 IHC mit der HER-2 FISH Bestimmung 40
4.2.4 Korrelation von HER-2 IHC/FISH mit den tumorhistologischen Parametern 41
4.3. Topoisomerase IIα Gen Amplifikation und Überexpression 42
4.3.1 Topoisomerase IIα Imunhistochemie 42
4.3.2 Topoisomerase IIα FISH 43
4.3.3 Vergleich der Topo IIα-IHC mit der Topo IIα FISH Bestimmung 44
4.3.4 Korrelation von TOP IIα IHC/FISH mit tumorhistologischen Faktoren 45
4.3.5 Korrelation von TOP IIα IHC/FISH mit HER-2 IHC/FISH 46
4.4 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark 47
4.4.1 Verteilung der disseminierten Tumorzellen vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie 47
4.4.2 Einfluss von HER-2 und Topoisomerase IIα auf Vorkommen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark 49
4.5 Rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben 50
4.5.1 Einfluss der tumorbiologischen Faktoren auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben 51
4.5.2 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben 52
4.5.3 Einfluss disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben 55
4.6 Gesamtüberleben 56
4.6.1 Einfluss der tumorhistologischen Faktoren auf das Gesamtüberleben 57
4.6.2 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das Gesamtüberleben 57
4.6.3 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit neoadjuvanter Chemotherapie 59

4.6.4 Einfluss von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark auf das Gesamtüberleben 60

5. Diskussion 61

5.1 Methoden der HER-2/neu und Topoisomerase IIα Bestimmung und deren Auswertung 62

5.1.1 HER-2/neu Bestimmung 62

5.1.2 Topoisomerase IIα Bestimmung 65

5.2 Anthrazyklinhaltige Chemotherapie und HER-2/ neu und Topoisomerase IIα 67

5.3 Disseminierte Tumorzellen in Blut und Knochenmark 71

6. Zusammenfassung und Ausblick 78

7. Literaturverzeichnis 80

8. Anhang 91

8.1 Verzeichnis Abbildungen 91

8.2 Verzeichnis Tabellen 92

8.3 Verzeichnis Abkürzungen 92

8.4 Danksagung 93

8.5 Lebenslauf 94

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit der am häufigsten vorkommende bösartige Tumor der Frau (*Ferlay et al 2004*).
Allein in Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Es steht an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenzen noch vor Darmkrebs, Bronchialkarzinom, Tumoren des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs und Eierstockkrebs. Es werden 47517 Neuerkrankungsfälle für das Jahr 2000 angegeben, das sind 24,4% aller weiblichen Krebserkrankungen. Auch im Bezug auf die Mortalitätsrate ist das Mammakarzinom eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland, nach Colonkarzinom, Bronchialkarzinom, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom und Ovarialkarzinom. Im Jahr 2000 starben 17814 Frauen an den Folgen eines Mammakarzinoms. Dies ist ein Anteil von 17,8% an der tumorbedingten Mortalität *(Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004. Robert Koch-Institut 2005)*.

In den USA und England wird seit den achtziger Jahren ein Rückgang der Mortalität von bis zu 20% beobachtet. Erklärbar ist dies damit, dass vermehrt Früherkennungsprogramme wie das qualitätsgesicherte Mammographiescreening bei Frauen ab 40 Jahren eingesetzt werden, um möglichst frühzeitig eine Erkrankung zu erkennen und somit auch frühzeitig zu behandeln. In Bayern wird seit Mai 2005 ein flächendeckendes Mammographiescreening angeboten. Auch wird der Rückgang der Mortalität mit neuen verbesserten Therapieansätzen wie der adjuvanten Chemotherapie in Zusammenhang gebracht *(Ries et al 2004, Blanks et al 2000)*.

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines Mammakarzinoms spielen sogenannte Risikofaktoren. Etablierte Risikofaktoren, welche durch Studien belegt wurden *(Armstrong et al 2000)* sind:

- *Familiäre Belastung (Verwandtschaft ersten und zweiten Grades)*
- *Alter (>50 Jahre)*
- *Gutartige Brusterkrankung: atypische Hyperplasie*
- *Alter bei erster Lebendgeburt (> 30 Jahre)*
- *Alter bei Menopause (> 55 Jahre)*
- *Alter bei Menarche (< 12 Jahre)*
- *Hormonersatztherapie*

Weiterhin stehen ein deutliches Übergewicht und Ernährungsgewohnheiten der westlichen Industrieländer mit kohlehydratreicher Kost in engem Zusammenhang mit dem Entstehen eines Mammakarzinoms *(Calle et al 2003, Lawlo et al 2004)*. Auch scheint ein regelmäßiger Alkoholkonsum das Brustkrebsrisiko zu erhöhen *(Smith-Warner et al 1998)*. Das höchste Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken haben allerdings Frauen mit einer Mutation des BRCA1-Gens, welches bei weniger als 0,5% der weiblichen Bevölkerung vorliegt *(Holinski-Feder et al 1998).* Das kumulative Risiko einer Mutationsträgerin, bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken, beträgt 65%. Keimbahnmutationen des BRCA2-Gens, sowie von ATM-, PTEN- und TP53 Genen zeigen ebenfalls ein stark erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Diese epidemiologischen Risikofaktoren sind Bedingungen, die in Bevölkerungsstudien bei der Untersuchung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen als krankheitsfördernde Umstände statistisch gesichert wurden. Der Einfluss dieser Faktoren auf den Einzelfall ist jedoch ungeklärt.

Nachdem die Diagnose Mammakarzinom gesichert worden ist, rücken neue Fragen und Probleme in den Vordergrund. Zu diskutieren ist, welche Operationstechnik gewählt werden sollte und ob eine Nachbestrahlung und/oder eine Chemotherapie –

wenn ja, vor oder nach der Operation - erforderlich sind. Hierbei ist es von äußerster Wichtigkeit abzuwägen, welche Therapieform einen tatsächlichen Nutzen für die Patientinnen hat. Vor allem die systemische Chemotherapie weist nicht nur gravierende körperliche Nebenwirkungen auf, sondern bringt auch eine große soziale und psychische Belastung mit sich *(Goldhirsch et al 1989).*

Da im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren das Mammakarzinom bereits frühzeitig eine generalisierte systemische Erkrankung darstellt, muss eine erfolgversprechende Therapie weit mehr als nur eine rein lokal operative Entfernung des Primärtumors beinhalten. Im Anschluss an die operative Entfernung des Primärtumors erfolgt deshalb häufig eine adjuvante Chemotherapie. In den letzten 25 Jahren haben die adjuvanten systemischen Chemotherapien immer mehr an Bedeutung erlangt und sind mittlerweile ein unverzichtbarer Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms geworden.

In den neuesten Empfehlungen zur Behandlung des primären Mammakarzinoms wird der systemischen Chemotherapie eine immer größere und wichtigere Bedeutung im Bezug auf den Behandlungserfolg beigemessen. Die Wirksamkeit dieser Therapieform wurde in einer großen Anzahl von randomisierten klinischen Studien untersucht und bestätigt. Eine Metaanalyse dieser Studien der Early Breast Cancer Trialists´ Collaborative Group (EBCTCG) veranschaulicht die Wichtigkeit der adjuvanten Chemotherapie im Bezug auf die Verhinderung von Rezidiven und tumorbedingten Todesfällen. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine endokrine Therapie mit Tamoxifen über ca. fünf Jahre bei hormonrezeptorpositiven Tumoren das Risikos eines Rezidives um 14% und die Anzahl der Todesfälle um 8%, nach 10 Jahren verringert. Dies konnte sowohl bei nodal-positiven, nodal negativen, prä- und postmenopausalen Patientinnen, als auch mit oder ohne zusätzlicher adjuvanter Chemotherapie nachgewiesen werden. Ebenso reduziert eine systemische Polychemotherapie über drei bis sechs Monate das Rezidivrisiko und die Sterblichkeit. Bei Frauen unter 50 Jahren verringert eine adjuvante Chemotherapie die absolute Sterblichkeit um ca. 15% nach fünf Jahren, bei Frauen zwischen 50 und 70 Jahren um ca. 6%. Hinsichtlich einer Prognoseverbesserung konnte gezeigt werden, dass eine Verbesserung unabhängig vom Rezeptorstatus und Tamoxifenbehandlung ist. Bei rezeptornegativen Frauen ohne

Tamoxifenbehandlung unter 50 Jahren verringerte sich die absolute Rückfallrate nach fünf Jahren um 13%. Bei Frauen zwischen 50 und 70 Jahren um 10%. Bei positivem Östrogenrezeptor und Tamoxifentherapie betrug die Verringerung der Rezidivrate bei den unter fünfzigjährigen ca. 8% und ca. 5% bei 50-69 Jährigen. Nodal-positive Frauen profitieren aufgrund ihres höheren Grundrisikos mehr von einer adjuvanten Chemotherapie als nodal-negative *(EBCTCG 2005*). So haben diese Ergebnisse dazu geführt, dass die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie ständig erweitert wird und derzeit fast jede Frau mit einem nicht metastasierten, invasiven Mammakarzinom eine systemische Therapie erhält.

Bei großen, primär nicht operablen Tumoren wird häufig eine neoadjuvante oder primäre Chemotherapie, d.h. eine Chemotherapie vor der operativen Entfernung des Tumors durchgeführt, um diesen zu verkleinern und dadurch operabel zu machen. Viele Studien belegen den Nutzen der neoadjuvanten Chemotherapie, bei der eine brusterhaltende Operation bei zunächst großem Primärtumor durchgeführt werden kann, ohne ein schlechteres Ergebnis im Bezug auf das Überleben zu erhalten *(Kaufmann et al 2003).*

Erschwerend kommt hinzu, dass das Mammakarzinom eine große Heterogenität aufweist und somit auch eine extreme Vielfalt einzelner Krankheitsverläufe mit sich bringt. Der Einsatz von adjuvanter Chemotherapie verhindert nicht immer ein rezidiv- oder tumorbedingte Todesfälle. So werden oftmals Frauen therapiert, die auch ohne eine Chemotherapie tumorfrei bleiben würden. Deshalb wird eine spezielle Einschätzung des individuellen Risikos einer Patientin erforderlich. Direkte bildgebende Verfahren, wie Ultraschall, Röntgen oder Skelettszintigramm geben erst zu einem relativ späten Zeitpunkt einen Hinweis auf eine Generalisierung.
Man versucht deshalb, durch Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren Anhaltspunkte zu gewinnen, um das Patientenkollektiv genauer zu charakterisieren, welches von adjuvanten systemischen Therapiemaßnahmen profitiert. Erst dadurch könnte es möglich sein, die Anzahl derjenigen Patientinnen zu verringern, die durch Nebenwirkungen mehr Schaden erleiden, als letztendlich von der Therapiemaßnahme zu profitieren.

1.2 Definition des Mammakarzinoms

Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom werden diejenigen malignen Tumoren der Brust zusammengefasst, die von den Epithelien mit Merkmalen von Milchgängen (duktales Karzinom) oder von lobulären Drüsenendstücken (lobuläres Karzinom) ausgehen *(Riede, Martin, Schaefer, 2004)*.

Nach der derzeit gängigen WHO Klassifikation unterscheidet man histologisch in eine invasive und in eine nicht invasive Form. Zu der nicht invasiven Form zählen das duktale Carcinoma in situ (DCIS) und die lobuläre Neoplasie (LN).
Zur invasiven Form zählen das invasiv duktale Karzinom, welches mit 40-75% der am häufigsten auftretende Tumortyp der Brustdrüse ist. Weitere invasive Formen sind das invasiv lobuläre (5-15%), das medulläre (1-7%), das tubuläre (1-2%), das muzinöse (1-2%) und das papilläre (max 1-2%) Karzinom. Weitere Karzinomformen wie das adenoid-zystische, sekretorische, apokrine und andere Sonderformen wie der Morbus Paget der Mamille - ein intraepidermal gelegenes Karzinom, ausgehend von den Milchgängen der Brustdrüse - treten in einer Häufigkeit von weniger als 1% auf *(Lebeau et al 2005)*.

1.3 Prognosefaktoren

Ein Prognosefaktor ist definiert als ein zum Zeitpunkt der Diagnose und Operation verfügbares Maß und steht in Beziehung mit der rezidivfreien (DFS) bzw. der Gesamtüberlebenszeit (OS) *(Clark et al 1996).*
Die Bestimmung eines Prognosefaktors hat also das Ziel, den Krankheitsverlauf für jede einzelne Patientin vorausschauend, also „prospektiv“, möglichst genau abzuschätzen. Zu den etablierten Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz gehören:

Das Ausbreitungsmuster = TNM-Status:

Tumorgröße
Axillärer Lymphknotenbefall
Fernmetastasierung

- Das Wachstumsmuster = Morphologie

  Grading (G1-3)
  Histologischer Typ
  Peritumorale Gefäßinvasion

- Steroidhormonrezeptoren:

  Östrogenrezeptor
  Progesteronrezeptor

- Menopausenstatus *(Funke, et al 2005)*

Als aussagekräftigster Prognosefaktor für Rezidiv und Überleben gilt nach wie vor der axilläre Lymphknotenstatus. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert direkt mit dem Risiko eines Rezidives und des Todes. Ebenso besteht eine Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und dem axillären Lymphknotenbefall *(Engel et al 2003).*

Die Morphologie des Tumors hat ebenfalls prognostische Bedeutung. Tubuläre, muzinöse oder papilläre Karzinome haben ebenfalls eine signifikant bessere

Prognose als das duktale Karzinom. Im Bezug auf das rezidivfreie Gesamtüberleben besteht eine Abhängigkeit vom histologischen Grading. Karzinome mit Einbruch von Tumorzellen in Lymph- oder Blutgefäße der Umgebung weisen ebenfalls eine schlechtere Prognose auf *(Funke et al 2005).*

Neben den bereits etablierten Prognosefaktoren eines Tumors gibt es derzeit eine große Anzahl neuer Prognosefaktoren, die die morphologischen, biochemischen, zellkinetischen und genetischen Eigenschaften eines Tumors berücksichtigen. Sie sollen helfen, zuverlässige Vorhersagen über den Krankheitsverlauf zu erstellen. Anhand neuer Prognosefaktoren soll eine Einteilung von Patientinnen in Gruppen möglich werden: Eine Gruppe schließt die Patientinnen ein, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren werden. Die andere Gruppe kann auf eine derartige nebenwirkungsreiche Behandlung auch verzichten, ohne dass dadurch ihre Überlebenszeit verringert wird.

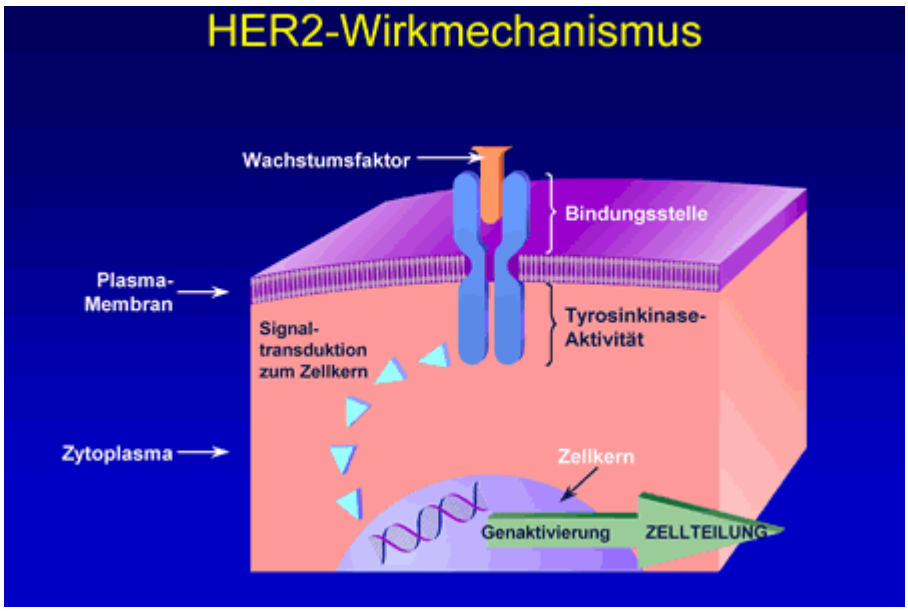
Der immunzytochemische Nachweis disseminierter, epithelialer Tumorzellen im Knochenmark ist ein neuer Prognosefaktor. Diese hämatogene Streuung von Tumorzellen wird in der aktuellen TNM-Klassifikation nicht als Metastasierung im herkömmlichen Sinne gewertet, sondern getrennt klassifiziert.
Nachgewiesen werden diese isolierten Tumorzellen im Knochenmark (ITZ-KM) mittels Zytokeratinantikörper gegen das Zytoskelett epithelialer Zellen, die normalerweise nicht in der gesunden Hämatopoese vorkommen. Das Vorliegen von ITZ im Knochenmark ist ein unabhängiger Prognosefaktor in allen Stadien der Erkrankung *(Braun et al 2003; Braun et al 2000b, Windswang et al 2003)*. Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen positiven Knochenmarksbefund aufweisen, haben eine deutlich schlechtere Prognose im weiteren Krankheitsverlauf. Diese Patientinnen haben ein kürzeres rezidivfreies Intervall und ein kürzeres Gesamtüberleben *(Braun et al 2005).*

Eine schlechte Prognose haben auch die Patientinnen, bei denen die isolierten Tumorzellen im Knochenmark persistieren. Hierbei ist der entscheidende Faktor hinsichtlich einer schlechten Prognose vor allem die Persistenz der Zellen im Knochenmark während der gesamten Dauer der Nachbehandlung *(Janni et al 2001, Janni et al 2005, Wiedswang et al 2004).*

Eine wiederholte Knochenmarkspunktion vor und nach Chemotherapie sowie während der Nachsorgeuntersuchungen könnte deshalb helfen, Patientinnen in einem großen Zeitraum zu überwachen, den weiteren Verlauf der Erkrankung zu erfassen und die Therapieplanung zu optimieren.

Ein weiterer Prognosefaktor ist das HER-2/ neu- Onkoprotein. Die Expression des HER-2/neu Onkoproteins zählt inzwischen zu den bestuntersuchten biochemischen Eigenschaften von Mammakarzinomen. Es handelt sich um einen transmembranösen Wachstumsfaktorrezeptor, dessen Gensequenz auf dem langen Arm von Chromosom 17 codiert wird. Während die extrazelluläre Domäne des Proteins an verschiedene Liganden bindet, übermittelt die zytoplasmatische Domäne mittels Aktivierung einer Tyrosinkinase Wachstumssignale in den Zellkern und führt dadurch zu erhöhten Mitoseraten und möglicherweise auch zur Streuung von Tumorzellen.

Abbildung 1: HER-2/neu

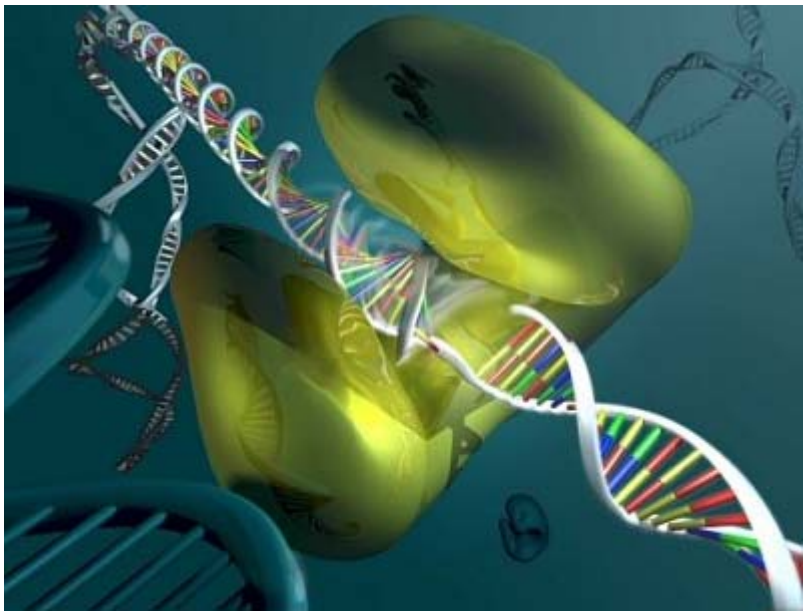


HER-2/neu Onkoprotein und dessen Wirkmechanismus

Eine Überexpression des HER-2/neu Onkoproteins kommt bei ca. 25% der invasiven Mammakarzinome vor. Eine solche Überexpression scheint durch eine Amplifikation des HER–2/neu-Gens zu entstehen. Erstmalig wurde 1987 über eine direkte Korrelation zwischen einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens und damit einer Überexpression des HER2/neu Onkoproteins und dem Auftreten eines frühzeitigen Rezidives sowie einer erniedrigten Gesamtüberlebensrate berichtet *(Slamon et al 1987).* Auch in neueren Studien wird darüber berichtet, dass eine Amplifikation der HER-2/neu Gen Kopie oder eine Überexpression des membranösen Proteins am Primärtumor eine schlechtere Prognose beinhalten *(Konecny et al 2003, Roos et al 1998, Holbro et al 2003)*.

In den letzten Jahren hat ein weiterer neuer Prognosefaktor an Bedeutung zugenommen: Topoisomerase IIα, ein Schlüsselenzym der DNA Replikation. Dieses nukleäre Protein ist eines von fünf Topoisomerasen, welches die Doppelhelix der DNA spaltet und somit die Entspiralisierung der DNA-Stränge einleitet. Die Entspiralisierung der DNA ist wiederum Voraussetzung für die DNA Replikation und Transkription. Die Topoisomerasen sind darum Hauptangriffsziele vieler antimitotischer und antiproliferativer Medikamente.

Abbildung 2: Topoisomerase IIα



Topoisomerase IIα

Topoisomerase IIα ist also ein wichtiger Faktor bei der Zellmitoserate. Eine erhöhte Expression von Topoisomerase IIα geht mit einem deutlich aggressiveren Krankheitsverlauf einher *(Depowski et al 2000)*. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine erhöhte Topoisomerase IIα-Expression mit einer deutlich erhöhten Proliferationsrate und somit auch einer schlechteren Prognose korreliert *(Rudolph et al 1999)*.

1.4 Prädiktive Faktoren

Prädiktive Faktoren geben Voraussagen über die Wahrscheinlichkeit eines guten Therapieansprechens. Lange Zeit war die Wahl der verwendeten Chemotherapie eher auf der Basis von bis dahin gemachten Erfahrungen gestützt. Um eine bessere Ansprechrate auf eine bestimmte Chemotherapie zu erhalten, sind jedoch zuverlässige prädiktive Faktoren nötig.

Ein deutlich besseres Ansprechen auf eine adjuvante endokrine Therapie haben zum Beispiel Patientinnen mit positivem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. In neueren Studien wird außerdem auch ein besseres Ansprechen der primären Chemotherapie bei negativem Hormonrezeptorstatus gezeigt *(Gianni et al 2002, Untch et al 2002)*.

Ein positiver HER-2/neu –Status ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (HERCEPTIN^{TM}), der gegen das HER-2/neu –Onkoprotein gerichtet ist. So haben Pietras et al und Baselga et al schon 1998 ein verbessertes Ansprechen der Chemotherapie und somit eine Verbesserung der Prognose bei HER-2/neu positiven Rezeptorstatus und der Therapie mit HERCEPTIN^{TM} in Kombination mit Doxorubicin/Cisplatin oder HERCEPTIN^{TM} kombiniert mit Doxorubicin /Paclitaxel beschrieben.
Seit 2000 ist eine Therapie mit HERCEPTIN^{TM} beim metastasierten Mammakarzinom zugelassen. In anderen Stadien der Erkrankung wurde die Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie im Rahmen klinischer Studien getestet. Hierbei zeigte sich bereits ein signifikanter Erfolg bei nodal-positiven Patientinnen mit einer Rückfallreduktion von 20%, sodass der Nutzen im Vergleich zu den Komplikationen einer HERCEPTIN^{TM} Behandlung überwiegt und seit 2006 eine Zulassung zur Begleitung der adjuvanten Chemotherapie beim nicht metastasierten HER-2/neu positiven Mammakarzinom erfolgte. Weiterhin scheint bei einer Überexpression von HER-2/neu ein vermindertes Ansprechen von Hormonrezeptorblockern wie Tamoxifen zu bestehen *(Carlomagno et al 1996)*. In neueren Studien allerdings weist eine primäre Therapie mit Aromatasehemmern auf eine bessere Ansprechrate hin *(Ellis et al 2001).*

Kontrovers diskutiert wird derzeit ein besseres Ansprechen von HER-2/neu positiven Tumoren auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie. Eine Metaanalyse von mehreren großen randomisierten Studien zeigte einen geringen, jedoch signifikanten Vorteil von anthrazyklinhaltigen Chemotherapien gegenüber CMF- haltiger Chemotherapie (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil), *(Early Breast Cancer Trialists´ Collaborative Group 2002)*. Ein deutlich besseres Ansprechen von Anthrazyklin- und Taxan-haltiger Chemotherapien bei HER-2/neu positiven Tumoren haben Yarden et al 2001 gezeigt. Pritchard et al haben 2006 gezeigt, dass HER-2/neu positive Tumore ein signifikant besseres Ansprechen auf Anthrazykline gegenüber CMF-haltiger Chemotherapie haben. Anthrazykline sind Topoisomeraseinhibitoren, ihr Hauptangriffsziel stellt die DNA-Replikation dar. Ihre Wirkung beeinflusst also direkt die Zellmitose. Die in der Klinik am meisten eingesetzten Topoisomerasehemmer sind die Anthrazykline.

Dieses bessere Ansprechen auf Anthrazykline bei HER2-Positivität könnte durch eine Co-Amplifikation des Topoisomerase IIα Gens welches in unmittelbarer Nachbarschaft vom HER-2/neu Gen auf Chromosom 17 liegt, bedingt sein.

Diese Vermutung wurde bisher in vitro von Jarvinen et al 2003 bestätigt. Ebenso haben Knoop et al 2005, Press et al 2005 und Slamon et al 2005 in randomisierten klinischen Studien gezeigt, dass Mammakarzinome mit Topoisomerase IIα-Amplifikation oder- Deletion ein besseres Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie haben.

In der 2006 veröffentlichten Studie von Tanner et al wurde gezeigt, dass ein besseres Ansprechen von anthrazyklinhaltiger Chemotherapie bei einer Überexpression von HER-2/neu hauptsächlich von einer gleichzeitigen Topoisomerase IIα Überexpression abhängig ist.

Desweiteren scheint eine neoadjuvante anthrazyklinhaltige Chemotherapie bei positivem Topoisomerase IIα-Status ebenfalls ein besseres Ansprechen zu haben *(MacGrogan et al 2003; Park, et al 2003)*.

2 Zielsetzung

Neueste Studien weisen auf ein besseres Ansprechen HER-2/neu positiver Tumoren auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie hin *(Pritchard et al 2006)*. Topoisomerase IIα liegt in unmittelbarer Nachbarschaft des HER-2/neu Gens auf Chromosom 17. Deshalb könnte ein positiver Topoisomerase IIα Status auch mit einem besseren Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie einhergehen.

Das Ziel dieser Studie war demnach zu untersuchen, ob eine HER-2/neu und eine Topoisomerase IIa Amplifikation/Überexpression am Tumorgewebe beim primären Mammakarzinom ein besseres Ansprechen auf eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie zeigt.
Als Nachweis für ein besseres Ansprechen diente der weitere klinischen Verlauf der Erkrankung, demnach also ein längeres rezidivfreies Überleben, metastasenfreies Überleben oder ein längeres Gesamtüberleben.
Ebenso sollte der Einfluss dieses verbesserten Ansprechens von HER-2/neu und Topoisomerase IIα positiven Tumoren auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie, im Zusammenhang mit dem Vorkommen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Patientinnen

In dieser Studie wurde Tumorgewebe eines Gesamtkollektivs von 54 Frauen mit nodal positivem primärem Mammakarzinom auf die tumorbiologischen Prognosefaktoren HER-2/neu und Topoisomerase IIa mittels Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) untersucht.
Bei allen 54 Patientinnen wurde das Knochenmark auf das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen untersucht. Die Knochenmarkspunktion erfolgte jeweils vor und nach einer systemischen Chemotherapie mit Anthrazyklinen. Die Einwilligung zur Knochenmarksaspiration erfolgte nach ausführlicher Aufklärung über den experimentiellen Charakter der Untersuchung und die potentiellen Nebenwirkungen anhand des Votums der Ethikkommission der LMU München.

In einem Zeitraum von 1994 bis zum 31.12 2004 wurden 2272 Knochenmarkspunktionen an der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Sie wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom bei der Primäroperation in Vollnarkose oder im weiteren Verlauf, während der onkologischen Nachbehandlung und bei anschließenden Nachsorgeuntersuchungen, in Lokalanästhesie, durchgeführt.
Nach der Operation in unserer Klinik wurden die Primärtumoren im histopathologischen Labor der I. Frauenklinik untersucht und anschließend in Paraffin eingebettet archiviert.

Alle 54 Patientinnen erhielten eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie.
Die Chemotherapien setzten sich wie folgt zusammen:

Chemotherapie	Anzahl	Prozent
Epirubicin / Cyclophosphamid	3	5,5%
Epirubicin / Cyclophosphamid / CMF	21	39%
Epirubicin / Cyclophosphamid / Taxane	27	50%
andere anthrazyklinhaltige Chemotherapie	3	5,5%

adjuvant	43	80%
neoadjuvant	7	13%
palliativ	4	7%

Bei allen Patientinnen erfolgte eine Knochenmarkspunktion vor Beginn und nach Beendigung der Chemotherapie. Die mittlere Zeit zwischen der ersten Knochenmarkspunktion und dem Beginn der Chemotherapie war eine Woche (0-16). Die zweite Knochenmarkspunktion erfolgte im Mittel weniger als einen Monat nach Beendigung der systemischen Chemotherapie (0-68).

3.2. Immunhistochemische Bestimmung der Topoisomerase IIα- Expression/ Überexpression

3.2.1 Reagentien

Primärantikörper:

Monoklonaler Maus Antikörper gegen Topoisomerase IIα
Klon SWT3D1, Isotyp: IgG1κ
Oncogene Research Products, Boston, Ma
1:40 in PBS

Blockierungsserum:

Pferdeserum
Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA
150 µl auf 10ml PBS steril

Sekundärantikörper:

Biotinylierter Brückenantikörper
Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Inc., Bulingame, CA
150 µl Blockierungsserum+ 5 µl Brückenantikörper auf 10 ml PBS steril

Avidin-Biotin-Komplex:

Streptavidin- Biotin- Enzymkomplex
Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Inc., Bulingame, CA
200 µl auf 5 ml PBS

DAB:

3,3 Diaminobenzidin

Dyna Chrome™ DAB Chromogen System; Beckman Coulter

250 µl Puffer Concentrat DAB Tampon+ 250 µl DAB Chromogen+ 100 µl 3% Hydrogen Peroxidase auf 5 ml Aqua dest.

PBS= Trispuffer pH 7,4:

90g NaCl+ 14,33g Na_2HPO_4+ 2,67g KH_2HPO_4 auf 1l H_2O

Na-Citratpuffer pH 6,0:

Lösung A: 0,1M Citronensäure 21,01g (Merck) auf 1L Aqua dest.
Lösung B: 0,1M Na-Citrat 29,41g (Merck) auf 1L Aqua dest.
18 ml Lösung A+ 82 ml Lösung B + 900 ml Aqua dest.

Xylol, Merck, Darmstadt

Ethanol, 100%, 96%, 70%

Aqua dest., Braun

6% H_2O_2

Hämatoxylin nach Mayer, Merck, Darmstadt

Eukitt Vitro-Clud®, Langenbrinck, Emmendingen

Mikroskop:

Axiophot Zeiss

3.2.2 Immunhistochemisches Färbeverfahren

Die immunhistochemische Färbung wurde an 1-3 μm dicken Paraffinschnitten des Primärtumors durchgeführt. Sie wurden auf Super Frost Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und über Nacht bei 37° getrocknet.
Als erster Arbeitsschritt erfolgte die Entparaffinisierung in Xylol (Merck) bei Raumtemperatur über 10 Minuten. Es folgte die Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) und nachfolgender Spülung in Aqua dest. (Braun).
Die Fixierung wurde durch Erhitzen im Dampfdrucktopf in Na- Citratpuffer pH 6,0 bei 100° über 5 Minuten gelöst. Nach dem Abkühlen über 20 Minuten wurden die Schnitte 10 Minuten in Aqua dest. (Baun) gespült und in PBS zwei mal 2 Minuten gewaschen.
Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Proben in 6% H_20_2 über 10 Minuten gegeben und anschließend in PBS für zwei mal 2 Minuten gespült.
Ein Blockierungsserum, 150µl auf 10 ml PBS (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Bulingame, CA, USA) wurde in der feuchten Kammer über 20 Minuten auf die Schnitte gegeben.
Dieses Pferdeserum diente zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen und zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine. Dadurch konnte eine unspezifische Anfärbung verhindert werden. Nach Abschütten der Lösung erfolgte die Inkubation mit 20 μl des Primärantikörpers, einem monoklonalen Maus Antikörper (Ab-1), Klon SWT3D1 (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA) in einem Verhältnis 1:40, bei Raumtemperatur über 45 Minuten in der feuchten Kammer.

Dieser monoklonale Maus Antikörper SWT3D1 (Robinson et al.; 1993) bindet innerhalb des ersten bis dritten C-Terminals von Topoisomerase IIα. Die Negativkontrolle wurde nicht mit dem Primärantikörper beschichtet, sondern nur mit PBS befeuchtet, um eine falsch- positive Färbereaktion auszuschließen. Anschließend erfolgte ein wiederholtes Waschen über zwei Minuten in PBS.
Es erfolgte die Inkubation der Schnitte, sowie auch der Negativ Kontrolle mit dem biotinylierten Brückenantikörper (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Bulingame, CA, USA) in einem Verhältnis 150 µl Blockierungsserum zu 5 µl Brückenantikörper auf 10 ml PBS über 30 Minuten in der feuchten Kammer.

Nachfolgend wiederholtes Waschen über 2 Minuten in PBS. Die Schnitte wurden im Anschluss daran über 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem ABC-Komplex, einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex, im Verhältnis 200µl auf 5 ml PBS inkubiert (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories,Inc., Bulingame ,CA,USA).

Avidin hat eine hohe Affinität zu Biotin und kann sich dadurch irreversibel an das Biotin binden. Diesen Effekt macht man sich bei der sogenannten ABC-Methode zu Nutze. Das ebenfalls biotinylierte Enzym, in diesem Fall Peroxidase konnte die Färbung ermöglichen.

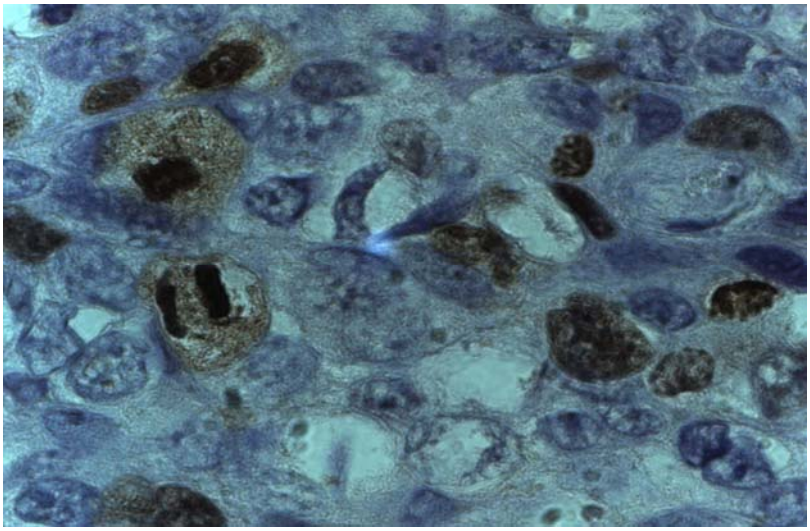
Zur Entwicklung der Peroxidase wurden die Präparate über 10 Minuten mit Chromogen-Substrat-Lösung DAB (3,3 Diaminobenzidin, Dyna Chrome^{tm} DAB Chromogen Gystem, Beckman Coulter) im Verhältnis 250 µl Puffer Konzentrat DAB Tampon zu 250 µl DAB Chromogen zu 100 µl 3% Hydrogen Peroxidase auf 5 ml Aqua dest. inkubiert.

Die überschüssige Farbe wurde mit Aqua dest. abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) über 5 Minuten und anschließender Spülung über 10 min in Leitungswasser. Danach erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol.

Als letzter Arbeitsschritt wurden die Proben mit Eukitt Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbereaktion erfolgte lichtmikroskopisch bei 100- bis 400- facher Vergrößerung durch zwei unabhängige Untersucher. Als positiv wurde eine homogene Anfärbung des Zellkerns gewertet, nicht die Intensität. Es wurden 100 Zellen in drei repräsentativen Gesichtsfeldern bewertet. Die Anzahl der positiven Zellkerne wurde in Prozent umgerechnet. Ab einer Anzahl von 50% positiver Zellen in einer Probe, wurde diese als Überexpression von Topoisomerase IIα gewertet.

Abbildung 3: Topoisomerase IIα Färbung



Topoisomerase IIα

3.3. Immunhistochemische Bestimmung der HER-2/neu- Expression/ Überexpression

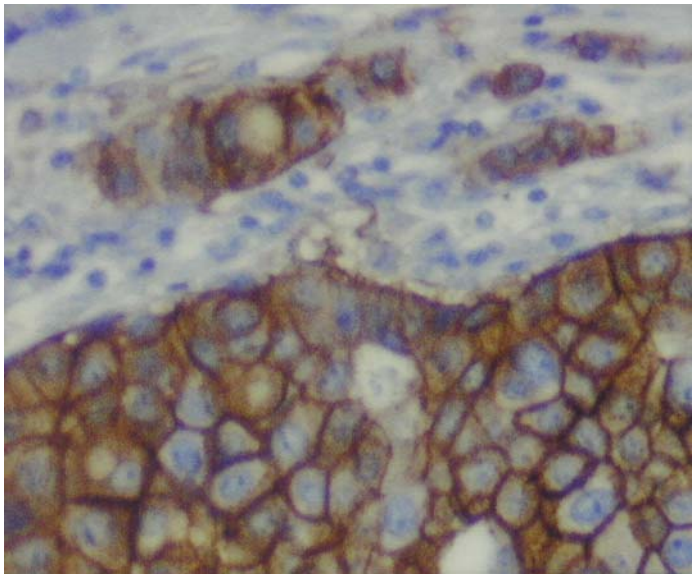
3.3.1 Immunhistochemisches Färbeverfahren:

Analog zur immunhistochemischen Bestimmung der Topoisomerase IIα Expression/ Überexpression bei Punkt 3.2.2, wurden alle Arbeitsschritte, Geräte und Reagentien übernommen.
Als Primärantikörper wurde jedoch der monoklonaler Maus IgG Antikörper gegen das c-erbB-2 Oncoprotein, NCL-CB 11 (Novocastra, UK) im Verhältnis 1:40, verwendet. Zur Detektion des Antikörpers diente die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Vectastain® Universal Elite ABC Kit der Firma Vector Laboratories).
Die Auswertung der Präparate durch zwei unabhängige Untersucher erfolgte semiquantitativ gemäß des HER-2 Scores *(Tabelle 4)*. Demnach wurde die Anzahl der HER-2/neu exprimierenden Zellen in Prozent bestimmt und die Vollständigkeit der Membranfärbung sowie deren Intensität bewertet. Eine mögliche zytoplasmatische Färbung fand keine Berücksichtigung in der Auswertung.

Tabelle 4 HER-2 Score zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung beim Nachweis von HER-2/neu

Immunhistochemie HER-2 Score	Reaktionsmuster	Bewertung
0+	keine Färbereaktion oder < 10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	negativ
1+	> 10% der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	negativ
2+	> 10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran Färbeintensität gering bis mittelgradig	schwach positiv
3+	> 10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärere Markierung der Zellmembran Färbeintensität stark	stark positiv

Abbildung 4: HER-2/neu Färbung



HER-2/neu: 3+

3.4 Bestimmung der HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- Gen- Amplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.4.1 Reagenzien:

3-fach DNA Sonde für Topo IIα/ HER-2/ CEP 17:

LSI, TOPIIα SpectrumOrange/ LSI, HER-2 SpectrumGreen/ LSI, CEP 17 Spectrum Aqua
Vysis Inc., IL

Path Vysion HER-2 DNA Sonden-Kit:

DAPI Gegenfärbung:

1000 ng/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) in Phenylendiamin Dihydrochlorid, Glyzerin, Puffer

NP-40

20×SSC Salz

Natriumchlorid und Natriumcitrat

Vysis, Inc., IL

Paraffin Pretreatment Kit:

Pretreatment:	50 ml Natriumthiozyanat (NaSCN)
Protease Puffer:	50 ml Natriumchlorid (NaCl) pH 2,0
Protease:	25mg 2500-3000U/ mg Pepsin A

Vysis, Inc., IL

20×SSC:

88,2g Tri-Natrium Citrat Dihydrat +175,3g Natrium Chlorid auf 1000ml H_20 pH 7,0

2×SSC:

100ml 20×SSC auf 900ml H_20 pH 7,0

2×SSC/NP40:

997ml 2×SSC+ 3ml NP-40pH 7,0

Steriles Aqua dest., Braun

Xylol, Merck, Darmstadt

Ethanol 100%

4% Formaldehyd, Fischar

Geräte:

Hybridisierungsgerät:

HyBrite
Vysis Inc., IL

Mikroskop:

Zeiss, Axiophot

Computerprogramm:

Axio Vision 3.0
Carl Zeiss Vision GmbH

3.4.2 Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH):

Die ungefärbten, 4-5μm dicken formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorgewebeschnitte wurden auf silanisierte Objekträger (Dako) aufgezogen und bei 37° über Nacht getrocknet.

Zur Entparaffinisierung wurden die Proben bei 55° über Nacht im Wärmeschrank aufbewahrt, danach mit Xylol (Merck) für zwei mal 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in Ethanol absolut für zwei mal 5 Minuten dehydriert. Es erfolgte die Vorbehandlung mit NHCL für 20 Minuten, Aqua dest. Steril (Braun) für 3 Minuten und Spülung in Waschpuffer mit 2×SSC in einem Verhältnis von 100 ml 20xSSC auf 900 ml H_20, pH 7,0. Anschließend wurden die Proben in 50 ml Natriumthiozyanat bei 80° im Wasserbad über 30 Minuten gegeben.

Als Zwischenschritt wurde nochmals in Aqua dest steril für 1 Minute und für zwei mal 5 Minuten in Waschpuffer gespült.

Danach erfolgte die Proteinverdauung mit einer Protease über 90 Minuten bei 37° im Wasserbad. Danach wurden die Schnitte mittels 4% Formaldehyd (Fischar) 5 Minuten fixiert und abermals mit Puffer gewaschen.

Jeder Objektträger wurde mit 10μl DNA-Sonde einer LSI TOP IIα/HER-2/CEP 17 Multi-Color Probe, (Vysis Inc., Dowerns Grove, IL, USA) beimpft, mit einem Deckglas versehen und in das Hybridisierungsgerät HyBrite (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) gelegt.

Dort erfolgte zuerst die Denaturierung der Proben für 5 min bei 75°, danach die Hybridisierung für mindestens 18 Stunden oder über Nacht bei 37° h.

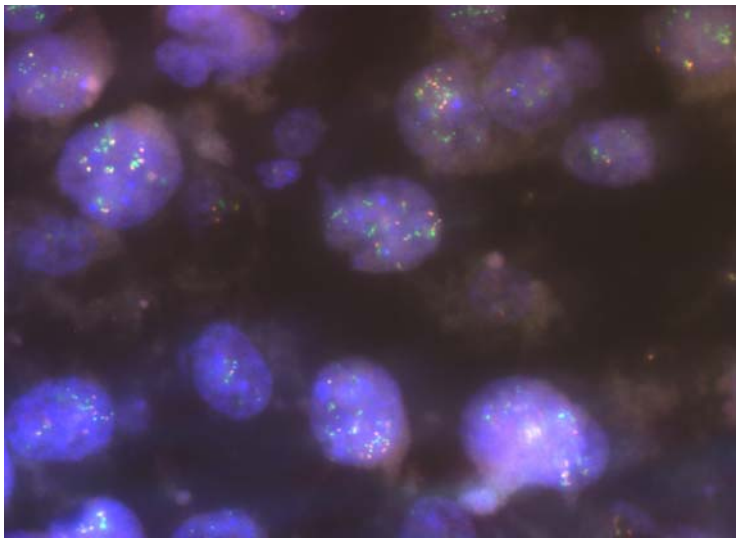
Die Deckgläser wurden entfernt und den Überschuss der Detektionsverbindung durch Spülen mit 2×SSC/NP40 im Verhältnis 997 ml 2xSSC+ 3 ml NP-40, für 3 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend bei 73° im Wasserbad für 3 Minuten, abgewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte mit 10μl DAPI, 4,6- Diamino-2-phenylindol. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Deckglas versehen und fixiert.

Die Schnitte wurden im Dunkeln bei - 20° gelagert.

Die Auswertung der Präparate nach der Anzahl der HER-2/neu- bzw. Topoisomerase- Genkopien wurde mit dem Zeiss Axioscope und der AxioCam durchgeführt. Die Archivierung der Ergebnisse erfolgte mit der Zeiss AxioVision Software. Die Ermittlung der HER-2/neu / TOPOIIα / Zentromer 17 (CEP17) -Ratio erfolgte aus dem Signalverhältnis von HER-2/neu / TOPOIIα zu CEP17 aus 60 gezählten Tumorzellkernen, indem die Gesamtzahl der HER-2/neu- Signale und der TOPO IIα- Signale durch die Gesamtzahl der Chromosom 17-Signale geteilt wurde. Wie im Protokoll des Sonden-Kits der Firma Vysis vorgegeben, lag eine HER-2/neu / TOPO IIα- Genamplifikation bei einer Ratio ≥ 2,0 vor. Die Ratio ermöglicht die Differenzierung zwischen einer tatsächlichen Genamplifikation und vermehrten HER-2/neu / TOPOIIα- Signalen aufgrund einer erhöhten Zahl des Chromosoms 17 (Chromosom 17-Polyploidie).

Abbildung 5: FISH Färbung



FISH Färbung HER-2/neu, Topoisomerase IIα und Zentromer

3.5 Knochenmarkaufbereitung und Immunzytologie mittels APAAP- Methode

3.5.1 Reagenzien zur Knochenmarksaufbereitung:

PBS= Trispuffer pH 7,4:

90 g NaCl+ 14,33 g Na_2HPO_4+ 2,67 g KH_2HPO_2 auf 1000 ml H_2O

Hanks Lösung, Biochrom, Berlin

Ficoll- Paque™ Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Trypanblau, Serva, Heidelberg

Erythrozytenlysepuffer:
Human Erythrocyte Lysing Kit
R&D Systems Inc.

Geräte:

Heraeus-Zentrifuge:

Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3.5.2 Knochenmarkaspirate und deren Aufbereitung

Pro Patientin wurden bei Punktionen des linken und rechten Beckenkamms durchschnittlich 2-8 ml Knochenmark mittels einer heparinisierten sterilen Spritze gewonnen und innerhalb von 48 Stunden in unserem Labor bearbeitet. Die Punktion erfolgte entweder in Vollnarkose direkt vor der operativen Entfernung des Tumors oder in Lokalanästhesie zu einem anderen Zeitpunkt.

Zur Aufbereitung des Knochenmarks wurden je 10 ml der Knochenmarkaspirate in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Hanks- Lösung (Biochrom,Berlin) auf 50 ml aufgefüllt. Zur Entfernung von Plasma, Fettpartikeln und Detritus wurden die Proben in der Heraeus- Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) mit 900 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abpippetiert. Das gewonnene Sediment wurde in ein mit 8 ml Ficoll (Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg) gefülltes Zentrifugenröhrchen, bis zu einem Endvolumen von 15 ml überschichtet. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2300 rpm über 20 Minuten. Dadurch gelangten Erythrozyten und Granulozyten weitgehend in das Sediment der Probe und Tumorzellen und Knochenmarkzellen reicherten sich in der Interphase an. Die so gewonnenen mononukleären Zellen wurden erneut abpipettiert, mit PBS in einem neuen Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt und bei 1600 rpm über 10 Minuten zentrifugiert.
In der Interphase verbliebene und durch die Zentrifugation nicht eliminierten Erythrozyten wurden über 5 Minuten mit Erythrozythen-Lysepuffer (Human Erythrocyte Lysing Kit,R&D Systems Inc.), lysiert. Anschließend erfolgte Waschen und Zentrifugieren bei 1600 rpm über 10 min. Nach Abgießen des Überstandes wurde das aufbereitete Sediment auf 2-3 ml mit PBS resuspendiert. Es wurden 10µl Suspension pro Probe mit 10µl Trypanblau (Serva, Heidelberg) angefärbt. Die Auszählung der angefärbten Zellen erfolgte in einer Neubauer Kammerzählung. Hierbei wurde die Zellzahl in 25 Quadraten ermittelt und zu einer Gesamtzellzahl quantifiziert.

3.5.3 Reagenzien zur Immunzytologie :

Primärantikörper:

Monoklonaler Maus Antikörper A45-B/B3
Klon: A45-B/B3, Isotyp: IgG1
Micromet GmbH, Planegg
Mischungsverhältnis: 1:100 in AB-Serum/PBS 1:10

Sekundärantikörper:

Polyklonales Kaninchen-Antiserum
Dako, Hamburg

APAAP- Komplex:

Alkalische Phosphatase und monoklonaler Maus Anti- Alkalische Phosphatase
Dako, Hamburg

Kontrollantikörper:

MOPC-21
Isotyp: Maus IgG1κ
Sigma, Deisenhofen
Mischungsverhältnis: 1:500 in AB-Serum/PBS 1:10

Substat- Chromogen- Lösung:

Lösung I : 90 mg Levamisol, Sigma, Deisenhofen
187,5 ml Aqua dest, Braun
62,5 ml 0,2 M Trispuffer, Sigma Deisenhofen

Lösung II: 50 mg Natriumnitrit $NaNO_2$ Merck, Darmstadt
1250 µl Aqua dest., Braun
500 µl Neufuchsin 5% in 2 M HCL, Merck, Darmstadt

Lösung III: 125 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat Sigma, Deisenhofen
1500 µl N, N- Dimethylformamid Sigma, Deisenhofen

AB Serum, Biotest AG, Dreieich

PBS= Trispuffer siehe 3.5.2

Geräte:

Hettich- Zentrifuge:

Hettich Universal 30 F, Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

3.5.4 Immunzytologie mittels APAAP- Methode

Der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark erfolgte mit dem unkonjugierten, murinen monoklonalen Antikörper A45-B/B3 (Micromet, Planegg), (Kasper et al 1987; Stosiek et al 1991.) Dabei handelt es sich um einen Antikörper, der die Heterodimere Cytokeratin 8/18 und Cytokeratin 8/19 sowie ein gemeinsames Epitop mehrerer Keratinkomponenten erkennt (Stigbrand et al 1998). Als Sekundärantikörper für die APAAP- Technik (Cordell et al 1984) diente ein polyklonales Kaninchenantiserum (Dako, Hamburg) gegen murine Immunglobuline in der Verdünnung 1:20. Dieser hatte die Funktion eines Brückenantikörpers zwischen dem murinen Primärantikörper (A45-B/B3) und dem murinen APAAP Komplex (Dako, Hamburg). Ein weiteres Patientenpräparat der gleichen Probe wurde anstelle des Primärantikörpers A45-B/B3 mit einem, als Kontrollantikörper fungierenden murinen Immunglobulin-Isotyp aus Myelomen behandelt, der keine humanen Epitope erkennt. Dieses war Klon: MOPC 21 (Sigma, Deisenhofen), So konnte eine falsch-positive Cytokeratinfärbung hämatopoetischer Zellen des Knochenmarks ausgeschlossen werden.

Zur immunzytochemischen Einfachfärbung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurden 4×10^6 Zellen aus der Probe entnommen und in einer Hettich-Zentrifuge bei 500 rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Aus dieser Probe wurden 4 Präparate mit jeweils 1×10^6 Zellen pro Objektträger gezogen. Diese sogenannten Zytospins wurden 12-24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bei –80° C gelagert.

Bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper stattfand, erfolgte zunächst eine Blockade der unspezifischen Bindungen. Durch mehrfaches Waschen mit PBS im Anschluss an die Knochenmarksaufbereitung wurden unspezifische elektrostatische Bindungen monoklonaler Antikörper möglichst gering gehalten Auch spezifische Bindungen durch kontaminierte Antikörper in polyklonalen Immunseren konnten durch diesen Schritt reduziert werden. Um kreuzreagierende antigene Determinanten der Antikörper zu minimieren, erfolgte eine Absättigung mit AB-Serum 10% in PBS. Ein weiterer Grund für die Inkubation der Präparate mit AB Serum 10% in PBS war die Absättigung unspezifischer F_c-Epitope bindender zellulärer Domänen. Dies geschah über 20 Minuten in einer feuchten Kammer. Im Anschluss daran wurde das Serum von den Präparaten lediglich abgeklopft, worauf dabei zu achten war, dass diese während des Vorganges nicht trockneten.

Es folgte nun die Inkubation mit dem Primärantikörper A45-B/B3 über 45 Minuten. Nach Waschen mit PBS über jeweils dreimal 3 Minuten wurde ein als Brückenantikörper fungierendes polyklonales Kaninchen-Antiserum eingesetzt, das gegen murine Immunglobuline gerichtet ist. Mit diesem Antiserum wurden die Objektträger über 30 Minuten inkubiert. Der verwendete Brückenantikörper stellte damit das Bindeglied zwischen dem murinen monoklonalen A45-B/B3 und einem murinen APAAP- Komplex dar, mit welchem anschließend über 30 Minuten inkubiert wurde. Durch erneutes Waschen mit PBS wurden ein letztes Mal ungebundene Immunglobuline entfernt.

Die Entwicklung der alkalischen Phosphatase (AP) im APAAP-Komplex wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt: Die Substratlösung für die AP-Entwicklung mit Hilfe des Chromogens Neufuchsin setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: Lösung I bestand aus 90 mg Levamisol-Hydrochlorid (Sigma, Deisenhofen), gelöst in 187,5 ml Aqua dest. Und 62,5 ml 0,2 M TRIS-Puffer (Sigma, Deisenhofen), um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren. Das Ansetzten von Lösung II erfolgte durch Lösen von 50 mg $NaNO_2$ (Merck, Darmstadt) in 1250 µl Aqua dest und 500 µl Neufuchsin 5% in 2 M HCL (Merck, Darmstadt). Lösung III bestand aus 125 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Sigma,Deisenhofen) gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid (Sigma, Deisenhofen).

Lösung II und III wurden unter ständigem Rühren der vollständig gelösten Lösung I zugesetzt und anschließend gefiltert. Die Präparate verblieben zur Entwicklung 20 Minuten in Substratlösung.

Bei jeder Patientin wurden $2x10^6$ Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Die positiven Ergebnisse wurden von einem zweiter Untersucher nochmals kontrolliert um morphologische Fehler auszuschließen.

Bei jeder Färbung wurde neben dem Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper ein Präparat mit einem murinen monoklonalen Immunglobulin-Isotyp inkubiert, der keine humanen Epitope erkennt. Wir verwendeten einen Maus Antikörper gegen myelopoetische Zellen (Sigma, Deisenhofen). Blieben die Zellen dabei ungefärbt konnte man eine spezies-abhängige, immunglobulin-spezifische Kreuzreaktion des Primärantikörpers, sowie des Sekundärantikörpers und des APAAP-Komplexes ausschließen. Des weiteren wurden Kontrollpräparate von kultivierten Zelllinien mit bekannter Antigenexpression eingesetzt, in unserem Fall die Brustkrebs Zelllinie BT 20-A. Bei einem positiven Färbeergebnis einer Antigen- positiven sowie einem negativen Resultat einer Antigen- negativen Zelllinie konnten spezifische und unspezifische Bindungen sicher interpretiert werden.

Eine Färbung konnte also stets als spezifisch gewertet werden, wenn sowohl die Kontrollfärbung mit Hilfe des Isotyp-Immunglobulintyps auf Patientenpräparaten, wie auch die Kontrollfärbung einer kultivierten Antigen- negativen Zelllinie mit dem spezifischen Immunglobulin keine angefärbten Zellen zeigten. Die Anfärbung von Kontrollpräparaten einer Antigen-positiven Zelllinie mit Hilfe eines spezifischen Imunglobulin- Typs musste dabei gleichzeitig ein positives Färberesultat zeigen.

Abbildung 6: Angefärbte Tumorzelle

3.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse aller Knochenmarksuntersuchungen, Immunhistochemie und FISH Analysen in Kombination mit den Patientencharakteristika und der Nachbeobachtung wurden mit Hilfe der Computersoftware „Statistical Package for the Social Sciences Version 11, 5“ (SPSS Inc.,Chicago,IL.,USA) berechnet und ausgewertet. Weiterhin fand zur Bearbeitung von Diagrammen und Tabellen das Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft Verwendung.

Zur Prüfung der Beziehung zwischen kategoriabler Variablen, wie dem HER-2/neu und Topoiomerase IIα Status, tumorhistologischen Faktoren und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde der Chi-Quadrat Test nach Pearson oder der Fisher-Test, in Abhängigkeit der Fallzahl, angewandt.

Die univariate Analyse des Einflusses von HER-2/neu, Topoisomerase IIα, tumorhistologischen Faktoren und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark auf das rezidivfreie- und auf das Gesamtüberleben wurde nach Kaplan-Meier berechnet (Kaplan & Meier,1958). Hierbei interessierte das Zeitintervall zwischen dem Startereignis, in unserer Arbeit der Tag der operativen Entfernung des Tumors und einem Zielereignis, in unserer Untersuchung das Auftreten eines Rezidives oder der Tod in Folge der Tumorerkrankung.

Die so erhaltenen Kurven wurden mit Hilfe des log-rank-Tests miteinander verglichen und auf Signifikanz überprüft, wobei als Signifikanzniveau $p < 0,05$ definiert wurde (Peto, 1977)

4. Ergebnisse

Aus einem Gesamtkollektiv von 54 Patientinnen mit Mammakarzinom wurden mittels FISH und immunhistochemischer Färbung (IHC) der HER-2/neu und der Topoisomerase IIα Status bestimmt. Alle Patientinnen erhielten eine Knochenmarkspunktion vor und nach Beginn einer systemischen anthrazyklinhaltigen Chemotherapie. Im folgenden sollen die Zusammenhänge zwischen den tumorbiologischen Faktoren untereinander und dem Knochenmarksbefund gezeigt werden. Des weiteren wird gezeigt, ob die tumorbiolgischen Faktoren Einfluss auf die Behandlung mit anthrazyklinhaltigen Chemotherapeutika haben.

4.1 Charakterisierung der Patientinnen

Insgesamt konnte Tumorgewebe von 54 Patientinnen mit einer Knochenmarkspunktion vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in dieser Studie untersucht werden.

Die mittlere Zeit zwischen der ersten Knochenmarkspunktion und dem Beginn der adjuvanten Chemotherapie war eine Woche (0-16). Die zweite Knochenmarkspunktion erfolgte im Mittel weniger als einen Monat nach Beendigung der systemischen Therapie (0-68).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug das Durchschnittsalter der Patientinnen 52 Jahre (32-74). 17 Patientinnen waren prämenopausal (31,5%), 37 (68,5%) postmenopausal.

Die Karzinome wurden nach der TNM- Klassifikation eingeteilt und histologisch auf Grading und Steroidhormonrezeptorstatus untersucht.

20 Patientinnen hatten einen pT1 Tumor (37%), 25 (46%) einen pT2, 3 hatten einen pT3 (6%) und 6 einen pT4 (11%) Tumor.

Alle Patientinnen waren nodal positiv mit einer mittleren Anzahl von 10 Metastasen (1- 36) von im Median 24 (8 – 41) untersuchten Lymphknoten.

Ein Tumor war G1 (2%), 23 waren G2 (46%) und 26 waren G3 (52%).

33 Patientinnen hatten einen negativen Östrogenrezeptor (65%) und 18 (35%) einen positiven. Einen negativen Progesteronrezeptor hatten 32 Patientinnen (63%), 21 (37) waren Progesteronrezeptor-positiv.

Eine Lymphangiosis fand sich bei 21 Patientinnen (42%). Bei 5 (16%) Pat. war eine Hämangiosis dokumentiert.

Alle 54 Patientinnen erhielten eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie, 43 eine adjuvante, 7 eine neoadjuvante und 4 eine palliative.
Die Chemotherapieschemata bestanden
21 mal aus Epirubicin /Cyclophosphamid / CMF,
27 mal aus Epirubicin / Cyclophosphamid / Taxane,
3 mal aus Epirubicin / Cyclophosphamid
3 mal aus anderen anthrazyklinhaltigen Kombinationen.

Tabelle 1:

Faktoren	n	%
Menopausenstatus	**54**	
prämenopausal	17	32
postmenopausal	37	68
Tumorgröße	**54**	
pT 1	20	37
pT 2	25	46
pT 3	3	6
pT4	6	11
Grading	**54**	
G1	1	2
G2	23	46
G3	26	6
Östrogen-Rezeptor	**51**	
positiv	18	35
negativ	33	65
Progesteron-Rezeptor	**51**	
positiv	19	37
negativ	32	63
Lymphangiose	**36**	
positiv	21	42
negativ	15	58
Hämangiose	**31**	
positiv	5	16
negativ	27	84
Chemotherapiezeitpunkt	**54**	
neoadjuvant	7	13
adjuvant	43	80
palliativ	4	7

4.2 HER-2/neu- Gen Amplifikation und HER-2/neu- Protein Überexpression

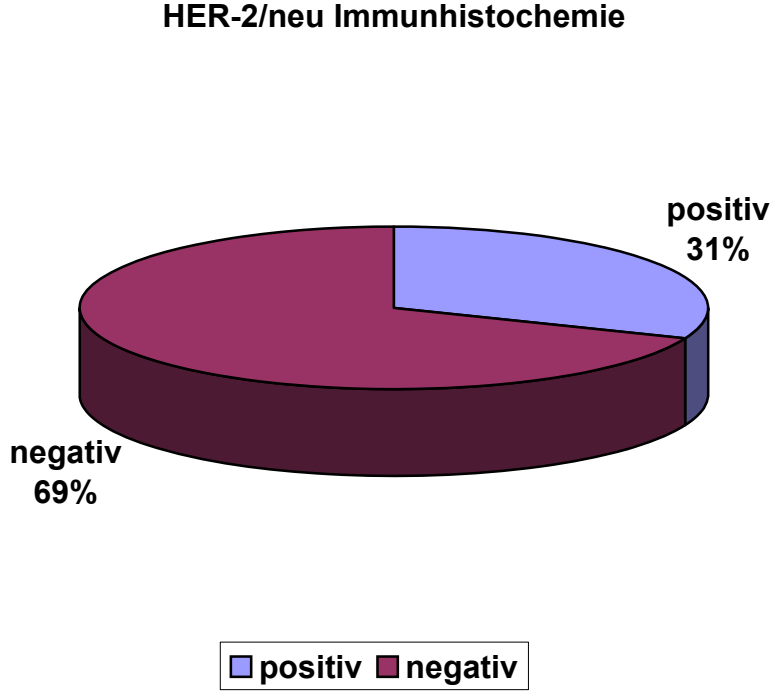
4.2.1 HER-2/neu Immunhistochemie:

In 49 der 54 untersuchten Fälle war ausreichend Gewebe und eine ausreichend gute Qualität der Färbung verfügbar, um die HER-2/neu- Protein Expression mittels Immunhistochemie zu bestimmen. Die Einteilung erfolgt anhand eines standardisierten Scores, (siehe 3.3.1, *Tabelle. 4*).

22 Fälle (45%) waren „0“ negativ, 12 Fälle (24%) waren „1+“ negativ, 9 Fälle (19%) waren „2+“ positiv und 6 Fälle (12%) waren „3+“ positiv gefärbt.

Als HER-2/neu positive Überexpression wurden nur die „2+“ und „3+“ Fälle gewertet. Somit waren also insgesamt 15 Fälle (31%) positiv.

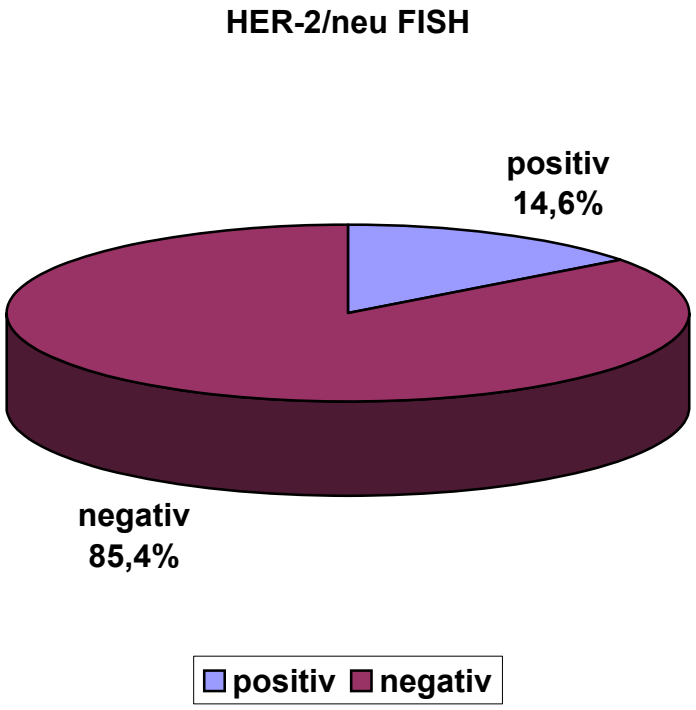
Abbildung 7: Verteilung der HER-2/neu Überexpression vs. keine Überexpression.



4.2.2 HER-2/neu FISH:

Insgesamt zeigten 7(14,6%) von 48 auswertbaren Fällen eine Amplifikation in der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung. 6 Tumorschnitte konnten mangels Qualität nicht ausgewertet werden.

Abbildung 8: Verteilung der HER-2/neu Amplifikation vs. keine Amplifikation.



4.2.3 Vergleich der HER-2/neu IHC mit der HER-2/neu FISH Bestimmung

Es konnten insgesamt an 44 Fällen sowohl die HER-2/neu- Expression mittels IHC als auch die HER-2/neu- Amplifikation mittels FISH durchgeführt werden.
Bei dem Vergleich beider Methoden zeigte sich, dass bei den 21, „0+“ Fällen der IHC Färbung nur 1 Fall (5%) in der FISH positiv war.
Bei den 9 „1+“ Fällen der IHC Färbung waren 2 (22%) FISH positiv. Genauso verhält es sich bei den 9 „2+“ positiven IHC Fällen.
Bei den 5 „3+“ positiven IHC Färbungen wiesen 2 (40%) eine Amplifikation in der FISH Anfärbung auf.
Es zeigte sich in 62% eine Übereinstimmung der positiven Färbereaktionen der IHC und FISH Methode auf.

Tabelle 2: Vergleich zwischen HER-2/neu FISH und HER-2/neu IHC.

HER-2/neu Färbereaktion	n	FISH neg	FISH pos	% pos
0	21	20	1	5
1+	9	7	2	22
2+	9	7	2	22
3+	5	3	2	40

4.2.4 Korrelation von HER-2/neu IHC/FISH mit den tumorbiologischen Parametern

Es zeigte sich keine Korrelation der HER-2/neu IHC/FISH Ergebnisse mit den tumorbiologischen Parametern und den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

Tabelle 3: Korrelation der HER-2/neu- Überexpression mit den tumorbiologischen Faktoren.

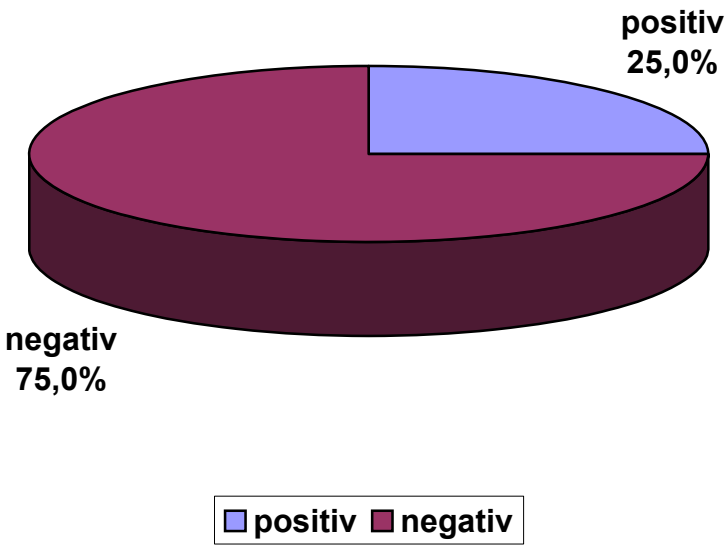
		HER-2/neu IHC					HER-2/neu FISH				
		neg	(%)	pos	(%)	p	neg	(%)	pos	(%)	p
Tumor Größe	<2cm	14	41	4	27	.33	16	39	1	14	.21
	≥2cm	20	59	11	73		25	61	6	86	
Grading	1,2	18	55	4	33	.21	20	53	1	17	.10
	3	15	45	8	67		18	47	5	83	
Östrogen-rezeptor	neg	20	65	8	53	.47	27	68	3	50	.40
	pos	11	35	7	47		13	32	3	50	
Lymph-angiose	nein	9	38	3	33	.82	9	35	2	40	.82
	ja	15	63	6	67		17	65	3	60	
Hämangiose	nein	18	82	7	88	.71	17	77	5	100	.24
	ja	4	18	1	12		5	23	0	0	
ITZ-KM 1	neg	26	77	12	80	.82	31	76	5	71	.82
	pos	8	23	3	20		10	24	2	29	

4.3. Topoisomerase IIα- Gen Amplifikation und Überexpression

4.3.1 Topoisomerase IIα Imunhistochemie

In der immunhistochemischen Färbung der Proben zeigte sich in 13 von 53 Fällen, (25%) eine um mehr als 50%ige Anfärbung der Zellkerne, was wir als positiv werteten.

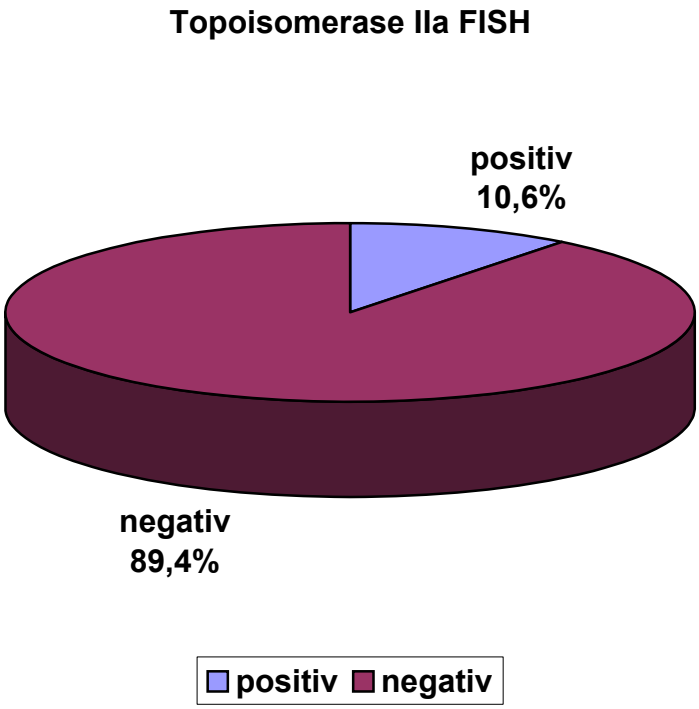
Abbildung 9: Verteilung der Topoisomerase IIα- Überexpression vs. keine Überexpression.



4.3.2 Topoisomerase IIα FISH

In der FISH Analyse konnten 47 Schnitte untersucht werden. Davon zeigten 5 eine Amplifikation (10,6%), die sich analog der HER-2/neu Amplifikation mittels dem Verhältnis zum Zentromer des Chromosom 17 bestimmt wurde. Es zeigte sich keine Deletion die sich als Verhältnis < 1 von Zentromer und TOPO IIα zeigen würde.

Abbildung 10: Verteilung Topoisomerase IIα- Amplifikation vs. keine Amplifikation.



4.3.3 Vergleich der TOPO IIα IHC mit der TOPO IIα FISH Bestimmung

Im Vergleich der beiden Methoden zeigte sich, dass bei den 35 negativen Fällen in der IHC Färbung 2 Fälle (6%) eine Genamplifikation aufwiesen.
Von 12 IHC positiven Fällen waren 3 Fälle (25%) amplifiziert. Mit einem p= 0,062 bestand keine statistische Signifikanz.

Tabelle 5: Vergleich zwischen TOPO IIα IHC und TOPO IIα FISH.

TOPO IIα IHC	n	FISH neg	FISH pos	% pos
neg	35	33	2	6
pos	12	9	3	25

4.3.4 Korrelation von TOPO IIα IHC/FISH mit tumorbiologischen Faktoren

Die immunhistologische Färbung zeigte nur eine Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus (p=0.03). Alle anderen histologischen Faktoren zeigten keine Korrelation.

In der FISH Analyse zeigten sich keine Korrelationen zu den histologischen Parametern.

Tabelle 6: Korrelation der TOPO IIα- Überexpression den tumorbiologischen Faktoren.

		TOPO IIa IHC					TOPO IIa FISH				
		neg	**(%)**	**pos**	**(%)**	**p**	**neg**	**(%)**	**pos**	**(%)**	**p**
Tumor Größe	<2cm	12	63	7	37	.18	16	100	0	0	.15
	≥2cm	28	82	6	18		26	84	5	16	
Grading	1,2	17	71	7	29	.46	20	100	0	0	.11
	3	20	80	5	20		19	83	4	17	
Östrogen-rezeptor	neg	29	88	4	12	**.03**	26	90	3	10	1.0
	pos	10	59	7	41		15	94	1	6	
Lymph-angiose	nein	11	79	3	21	1.0	9	90	1	10	1.0
	ja	16	76	5	24		18	90	2	10	
Hämangiose	nein	20	77	6	23	1.0	18	86	3	14	1.0
	ja	4	80	1	20		5	100	0	0	
ITZ-KM 1	neg	30	73	11	27	.71	31	89	4	11	1.0
	pos	10	83	2	17		11	92	1	8	

4.3.5 Korrelation von TOPO IIα IHC/FISH mit HER-2/neu IHC/FISH

Keine der Proben zeigte eine Topoisomerase IIα- Amplifikation ohne gleichzeitiger HER-2/neu- Koamplifikation. Von den 7 amplifizierten HER-2/neu Proben wiesen 5 ebenfalls eine Amplifikation von Topoisomerase IIα auf. Es zeigte sich also eine 71% Koamplifikation.

Bei der Untersuchung der Übereinstimmung der HER-2/neu- Überexpression mit der Topoisomerase IIα- Überexpression zeigte sich eine Korrelation von HER-2/neu FISH mit TOPO IIα IHC (p= 0.007) und TOPO IIα FISH (p< 0.01).

Tabelle 7: Korrelation HER-2/neu IHC/FISH mit TOPO IIα IHC/FISH.

		TOPO IIa IHC					**TOPO IIa FISH**				
		neg	**(%)**	**pos**	**(%)**	**p**	**neg**	**(%)**	**pos**	**(%)**	p
HER-2/neu IHC	0,1	26	76	8	24	.48	27	93	2	7	.31
	2,3	9	64	5	36		11	79	3	21	
HER-2/neu FISH	neg	34	83	7	17	**.01**	40	100	0	0	**<.01**
	pos	2	29	5	71		2	29	5	71	

4.4 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

4.4.1 Verteilung der disseminierten Tumorzellen vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie.

Insgesamt hatten 13 Patientinnen (24%) Zytokeratin- positive Zellen im Knochenmark vor der Chemotherapie, 41 (76%) waren negativ. Der Median der entdeckten Zellen betrug 3.0 Zytokeratin- positive Zellen bei 2 x 10^6 der mononukleären Zellen (1-269).

In der zweiten Aspiration nach der Chemotherapie waren 17 (31%) positiv, 37 (69%) negativ, wieder betrug der Median 3.0 Zytokeratin- positive Zellen von 2 /x 10^6 mononukleären Zellen (1-166).

32 Patientinnen (59%) mit negativem Befund bei erster KM-Aspiration blieben nach der Chemotherapie negativ.

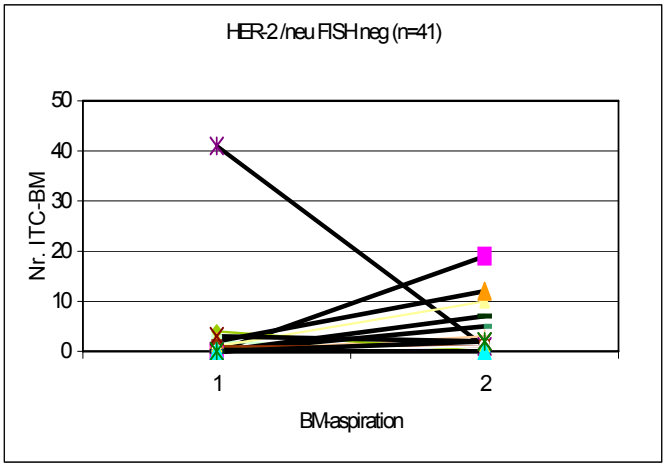
5 Patientinnen (9%) wurden negativ, nachdem sie zuvor positiv getestet worden waren.

9 Patientinnen (17%) mit negativer erster Knochenmarksaspiration wurden positiv bei der zweiten Aspiration nach Chemotherapie.

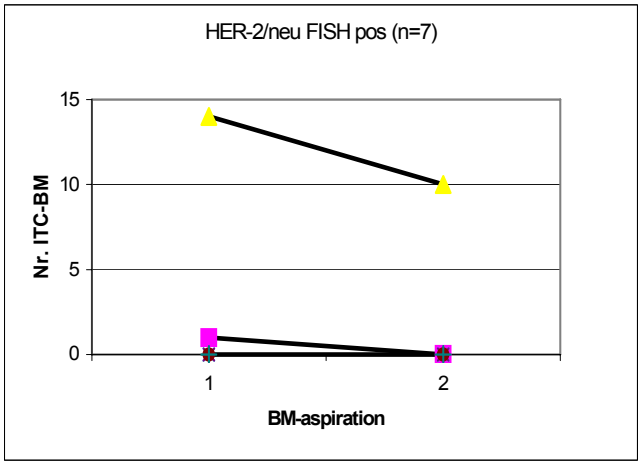
8 Patientinnen (15%) zeigten vor und nach Chemotherapie Zytokeratin- positive Zellen (Abbildung 11).

Abbildung 11: Vorkommen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie.

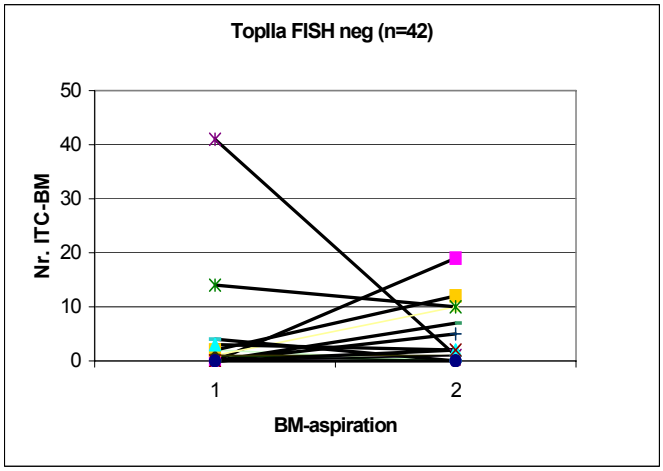
a. HER-2/neu FISH negative Patientinnen (n=41)
b. HER-2/neu FISH positive Patientinnen (n=7)
c. TOPO IIα FISH negative Patientinnen (n=42)
d. TOPO IIα FISH positive Patientinnen (n=5)



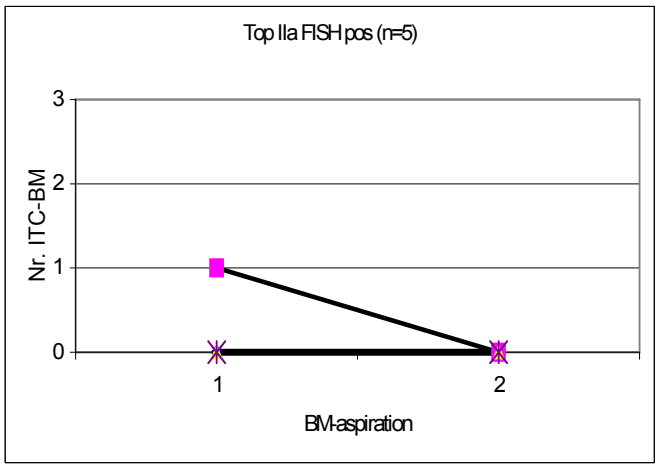
a.



b.



c.



d.

4.4.2 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das Vorkommen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Um den Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu bestimmen, wurde in den Untergruppen der HER-2/neu positiven und TOPO IIα positiven Fällen auf eine Änderung des Knochenmarkbefundes nach der zweiten Aspiration geachtet. Hierbei zeigte sich, dass von 5 Patientinnen, die in der zweiten Aspiration negativ getestet wurden, 2 HER-2/neu IHC positiv waren. Im Gegensatz dazu wurde nur 1 von 7 Patientinnen mit ursprünglich negativem Befund positiv. Mit einem p=0.29 besteht ein Trend, in diesem Fall einen negativen Knochenmarksbefund zu bekommen oder diesen zu erhalten.
Einen ähnlichen Trend (p=0.16) zeigte sich bei TOPO IIα FISH, hierbei war ebenfalls eine von 4 Patientinnen, die von positivem zu negativem Befund wechselten TOPO IIα positiv.
Keine der Patientinnen, die eine Topoisomerase IIα Amplifikation aufgewiesen hatten, hatte einen positiven Knochenmarksbefund nach der Chemotherapie.

Tabelle 8: Knochenmarkbefund vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in Korrelation mit HER-2/neu und TOPO IIα.

Knochen-mark	alle Pat.		HER-2/neu IHC			HER-2/neu FISH			TOPO IIa IHC			TOPO IIa FISH		
	n	%	neg	pos	**p**	neg	pos	**p**	neg	pos	**p**	neg	pos	**p**
neg → neg	32	59	20	11	**.29**	23	5	**.40**	24	8	**.73**	24	4	**.16**
neg → pos	9	17	6	1		8	0		6	3		7	0	
pos → neg	5	9	3	2		3	1		4	0		3	1	
pos → pos	8	15	5	1		7	1		6	2		8	0	

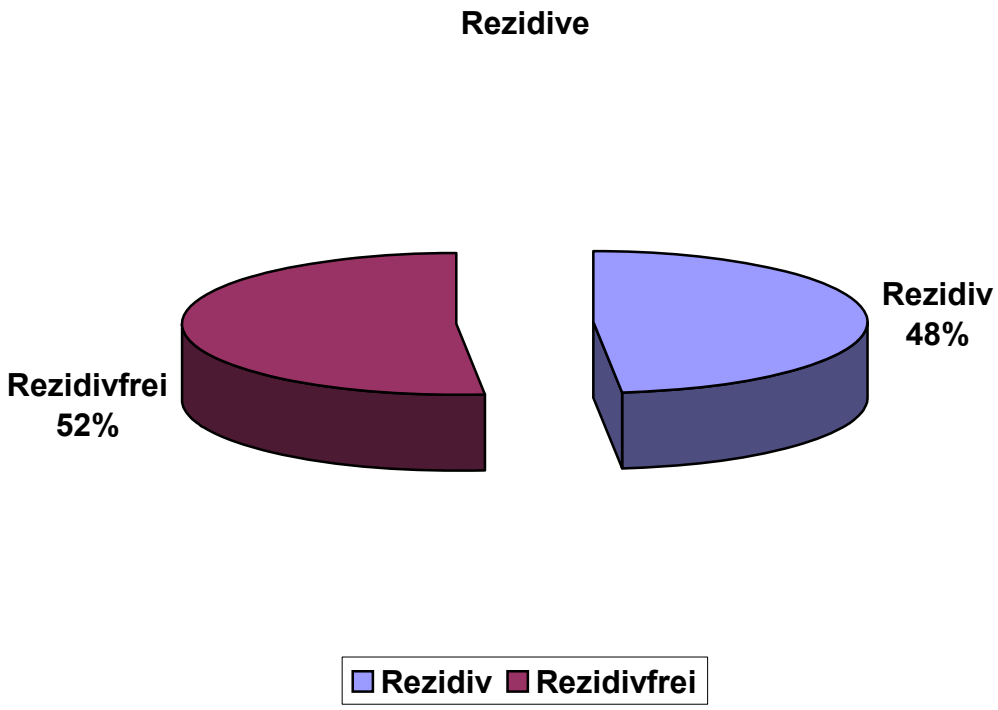
Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation von Knochenmarkbefund und HER-2/neu und TOPO IIα- Status.

4.5 Rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben

Der Median des rezidivfreien Überlebens betrug 33,5 Monate (1-83).

Insgesamt erlitten 26 Patientinnen ein Rezidiv. 21 davon Fernmetastasen, 10 bekamen ein Lokalrezidiv und 7 beides.

Abbildung 12: Rezidive

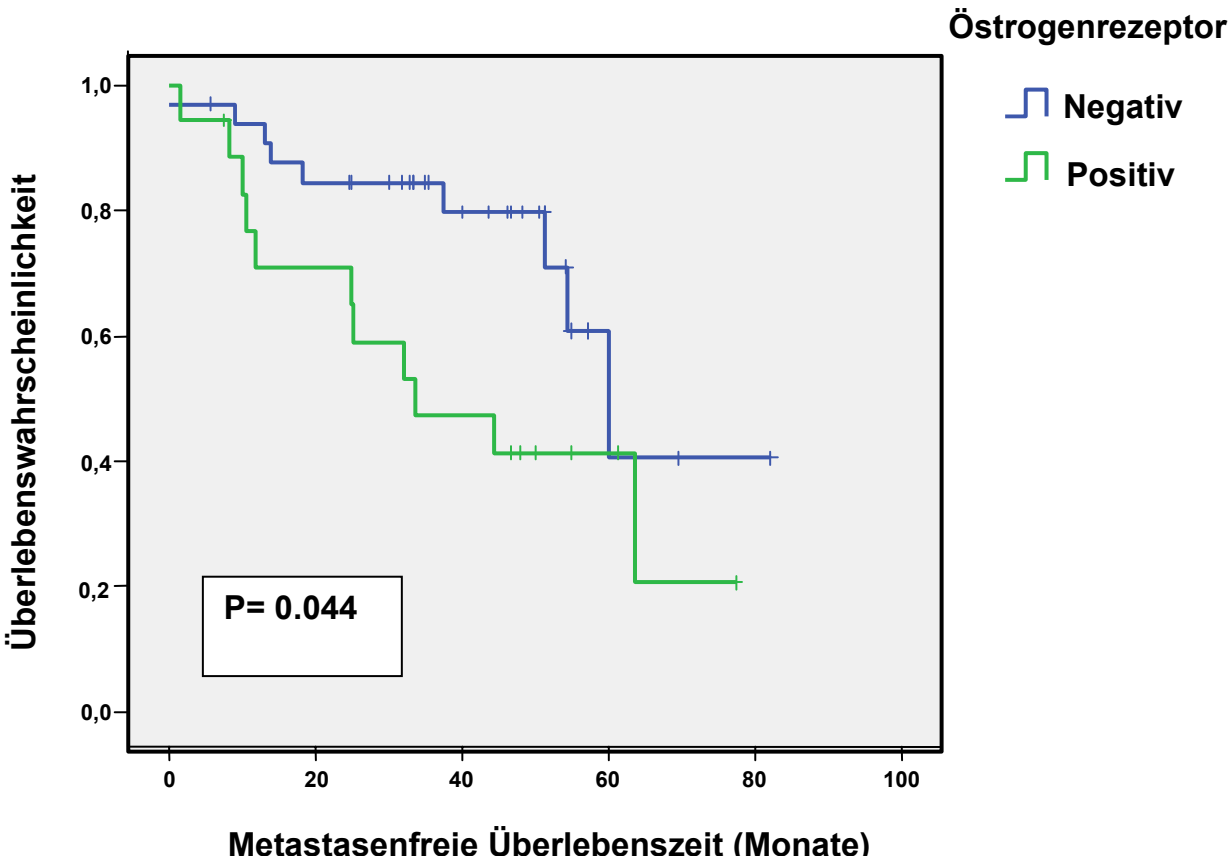


4.5.1 Einfluss der tumorbiologischen Faktoren auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben

Keiner der von uns untersuchten tumorbiologischen Faktoren zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben.

Im Bezug auf das fernmetastasenfreie Überleben zeigte nur ein negativer Östrogenrezeptorstatus mit p=0.04 einen signifikanten Zusammenhang.

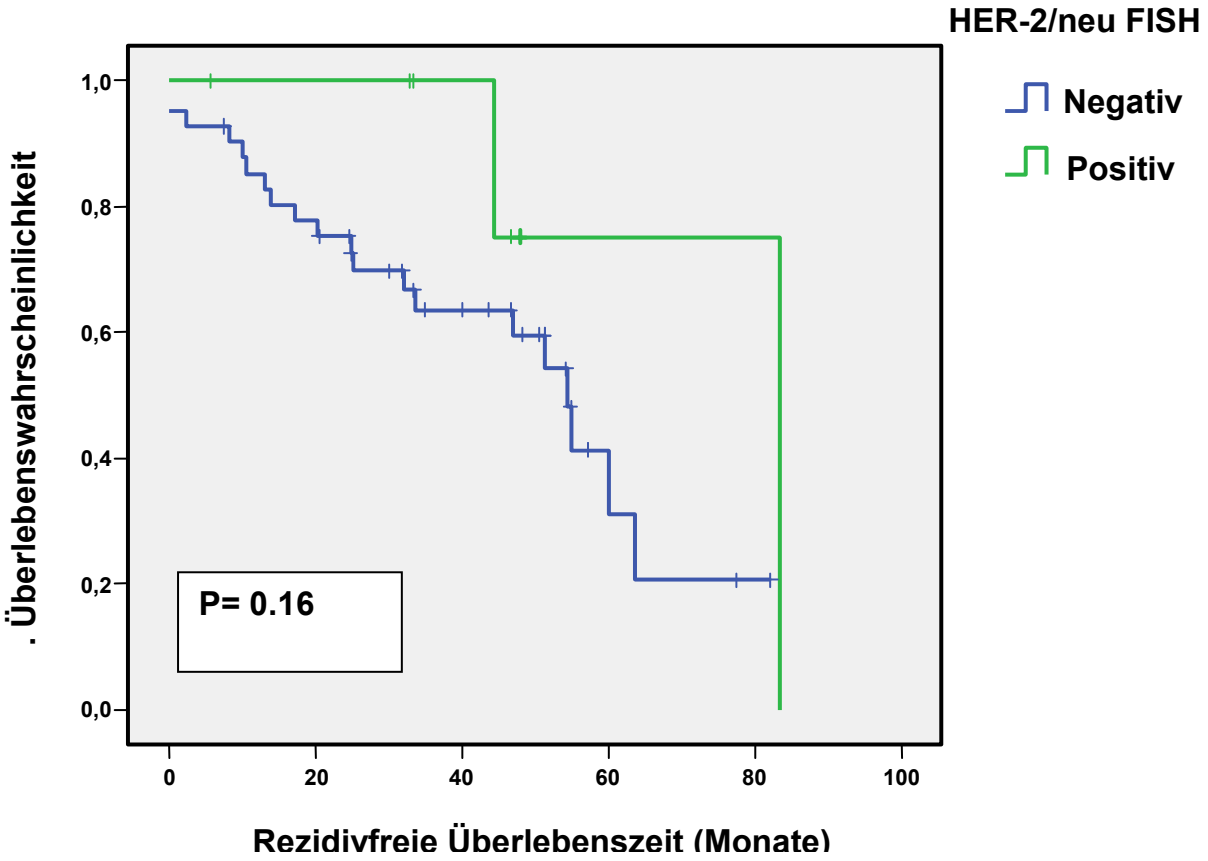
Abbildung 13: Kaplan-Meier Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus.



4.5.2 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben

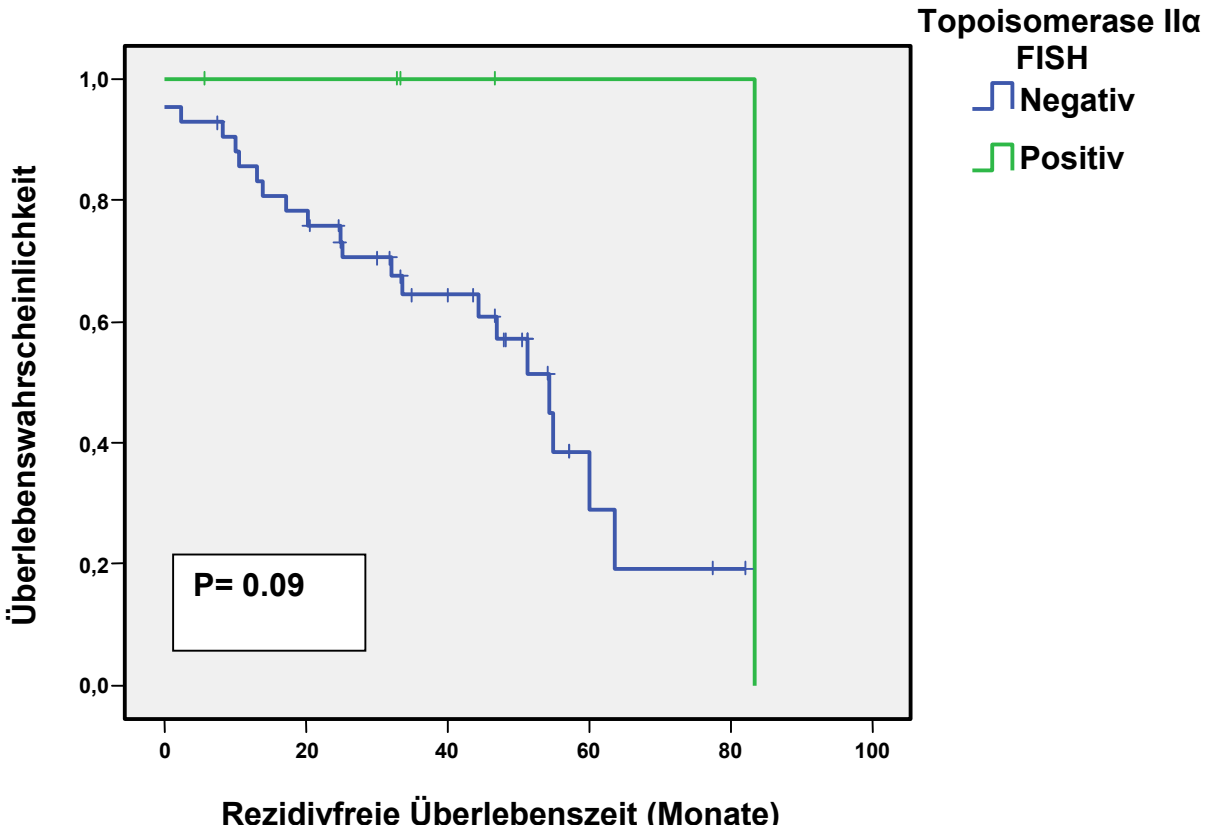
Ein positiver HER-2/neu FISH Status zeigte mit p=0.16 einen Trend zum rezidivfreien Überleben.

Abbildung 14: Kaplan-Meier Analyse des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von HER-2/neu FISH.



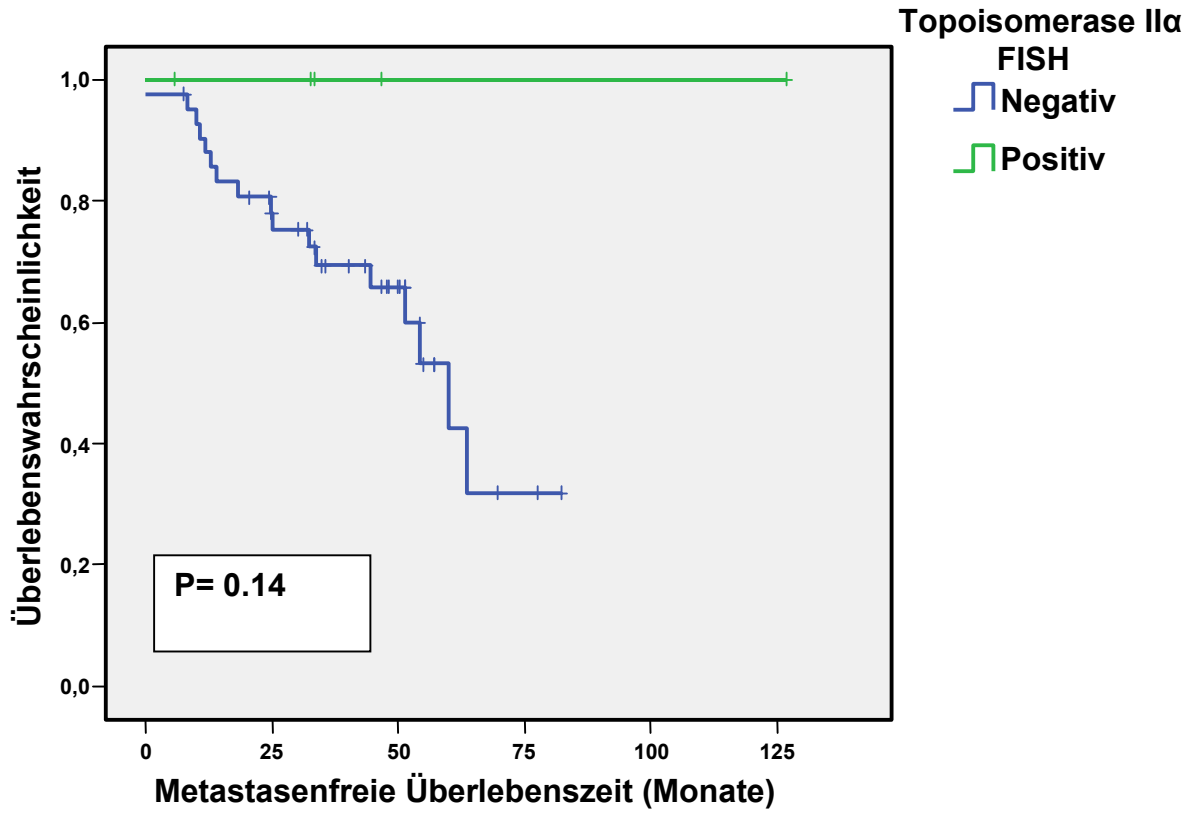
Ebenso zeigte ein positiver Topoisomerase IIα FISH Status mit p=0.09 einen Trend zu verlängertem rezidivfreien Überleben.

Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von Topoisomerase IIα FISH.



Im Hinblick auf ein fernmetastasenfreies Überleben zeigte sich bei Topoisomerase IIα FISH Positivität ein Trend zu einem längerem rezidivfreien Intervall: p=0.14.

Abbildung 16: Kaplan-Meier Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit von Topoisomerase IIα FISH.



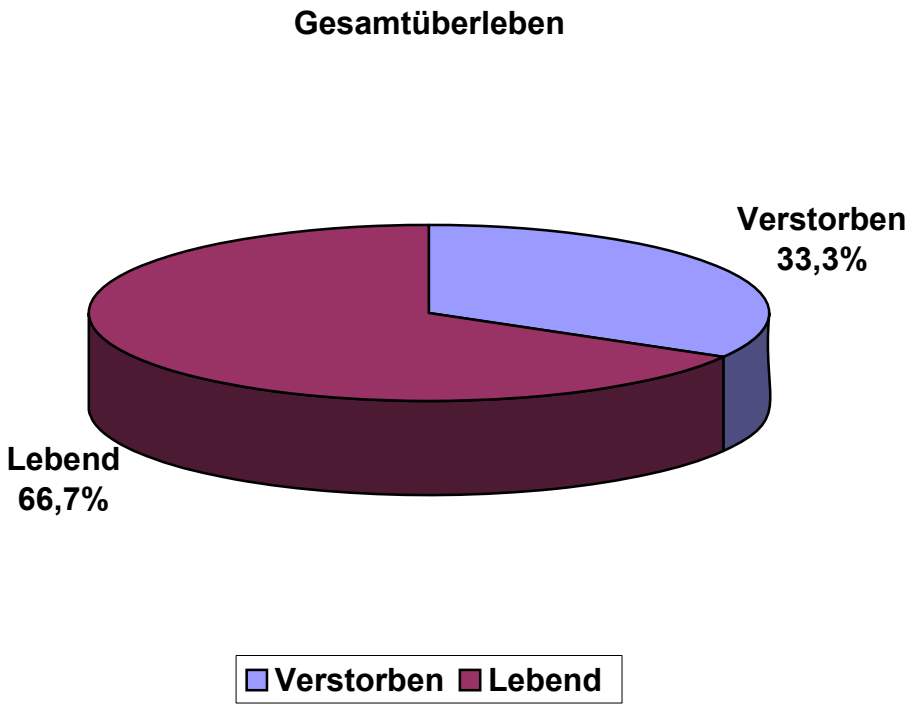
4.5.3 Einfluss disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auf rezidiv- und fernmetastasenfreies Überleben

Das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das rezidiv- und fernmetastasenfreie Überleben.

4.6 Gesamtüberleben

Nach einer medianen Beobachtungszeit von 44 Monaten (6 – 127), verstarben 18 Patientinnen an den Folgen ihres Tumorleidens. Abbildung 17:

Abbildung 17: Gesamtüberleben



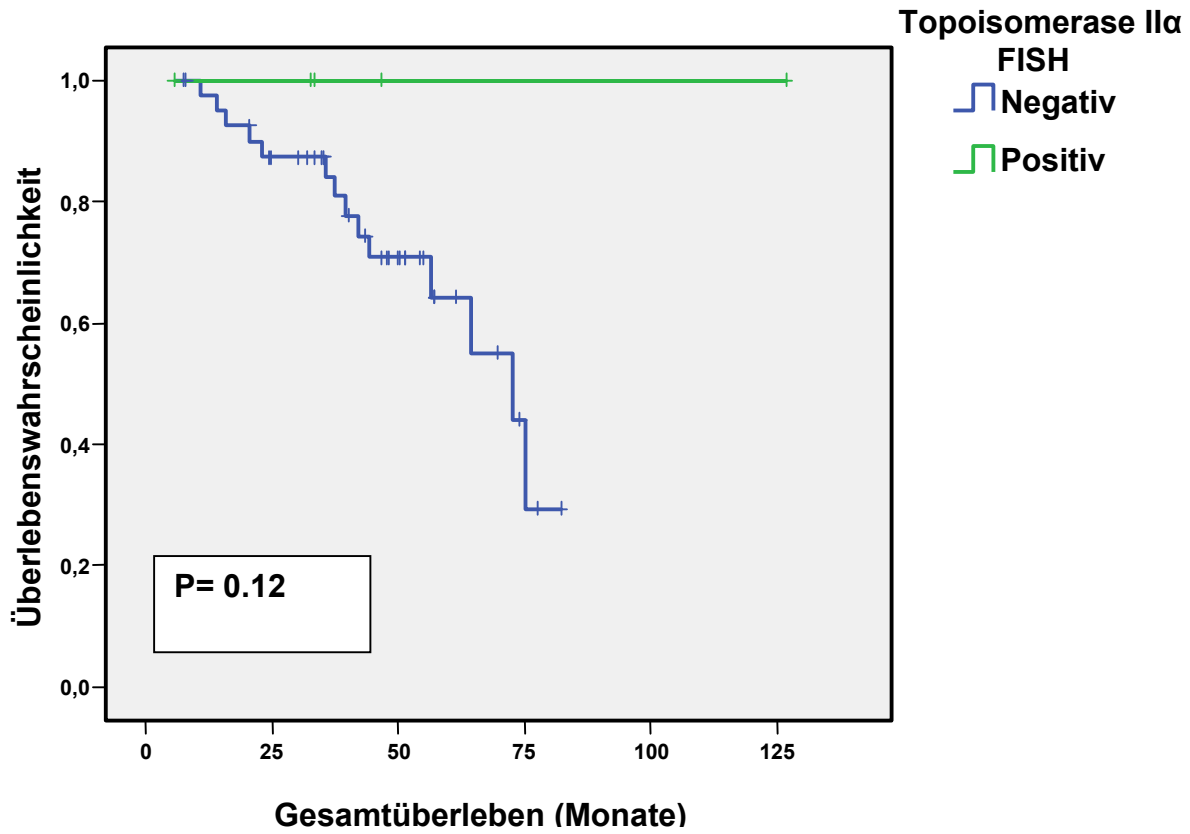
4.6.1 Einfluss der tumorbiologischen Faktoren auf das Gesamtüberleben

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen tumorbiologischen Faktoren und dem Gesamtüberleben.

4.6.2 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das Gesamtüberleben

Mit einem p=0.12 zeigte sich ein Trend zum längeren Gesamtüberleben von Topoisomerase IIα positiven Tumoren.

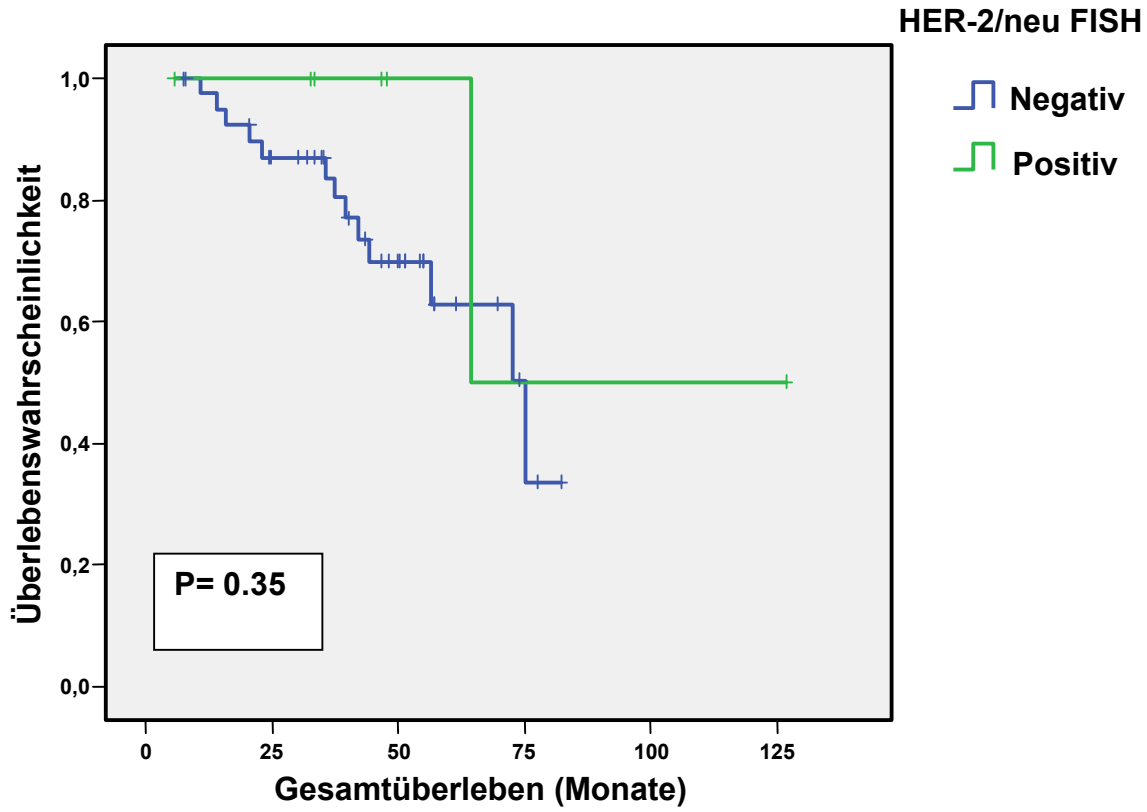
Abbildung 18: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von Topoisomerase IIα FISH.



Bemerkenswert ist, dass keine Patientin mit Topoisomerase IIα positivem Tumor in der FISH Analyse an den Folgen eines Rezidives oder direkt an der Erkrankung verstarb.
Wegen der geringen Fallzahl von n=5 konnte keine Signifikanz festgestellt werden, p=0.19.

Im Hinblick auf den HER-2/neu- Status konnte mit einem p=0.35 kein signifikanter Zusammenhang zum Gesamtüberleben gezeigt werden.

Abbildung 19: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von HER-2/neu FISH.



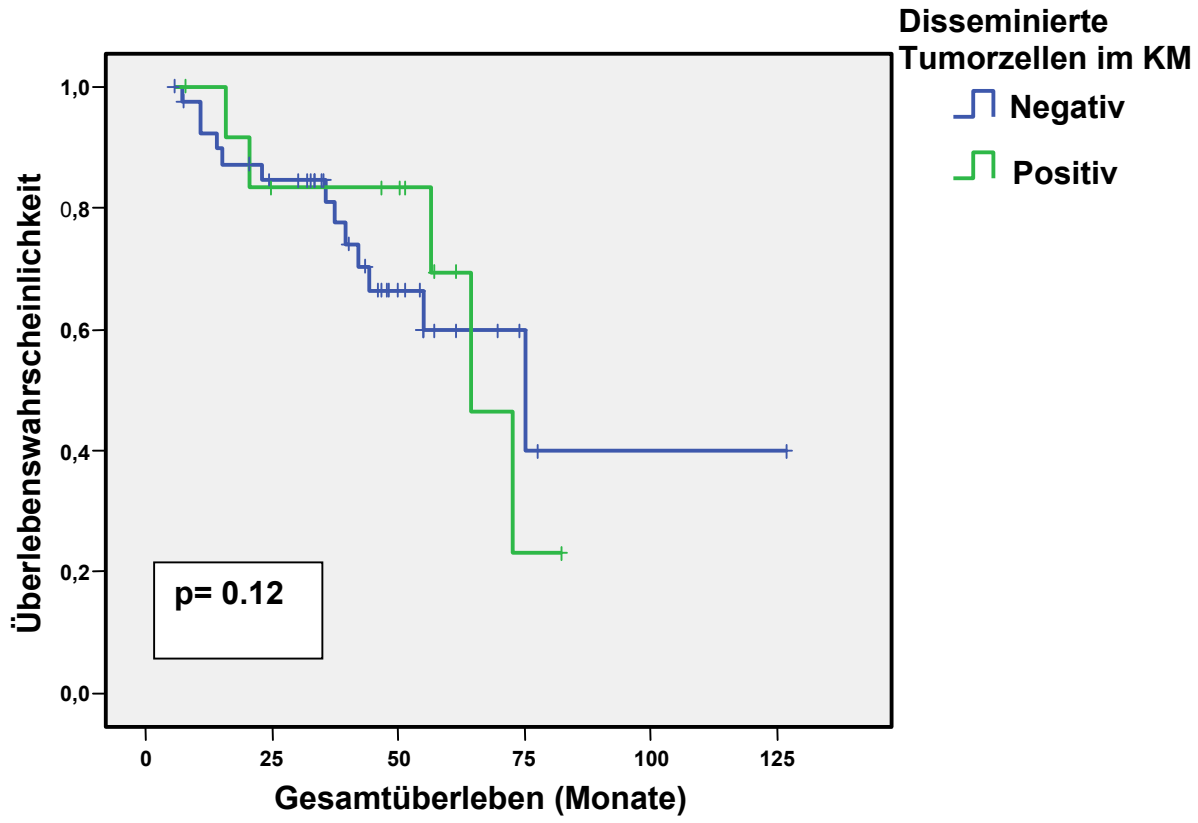
4.6.3 Einfluss von HER-2/neu und Topoisomerase IIα auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit neoadjuvanter Chemotherapie

Insgesamt erhielten 7 Patientinnen eine neoadjuvante Chemotherapie. In dieser Untergruppe gab es nur eine einzige Patientin, die HER2/neu und Topoisomerase IIα positiv war. Sie hatte ein inflammatorisches Mammakarziom, das normalerweise einen aggressiven Verlauf zeigt. Trotzdem war sie die einzige Patientin in dieser Gruppe, die dennoch kein Rezidiv erlitt und die nach der Nachbeobachtungszeit von 4 Jahren nicht verstorben war. Daher lässt ein positiver HER-2/neu und Topoisomerase IIα Tumor möglicherweise auf ein besseres Ansprechen von neoadjuvanter Chemotherapie schliessen. Wegen der geringen Fallzahl konnte jedoch keine eindeutige signifikante Aussagen gezeigt werden.

4.6.4 Einfluss von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark auf das Gesamtüberleben

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, weder vor noch nach Chemotherapie, und dem Gesamtüberleben (p=0.12).

Abbildung 20: **Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.**



5. Diskussion

Gegenstand der Untersuchungen dieser Studie waren die HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- Amplifikation/Überexpression am Tumorgewebe beim primären Mammakarzinom, das Ansprechen auf eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie, sowie der Zusammenhang mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM).

Als Nachweis für ein besseres Ansprechen diente der weitere klinischen Verlauf der Erkrankung, demnach also ein längeres rezidivfreies oder fernmetastasenfreies Überleben oder ein längeres Gesamtüberleben.

In dieser Studie tendierten Patientinnen mit positivem HER-2/neu und Topoisomerase IIα Status des Primärtumors dazu, nach dem Erhalt einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie einen negativen Knochenmarksbefund beizubehalten bzw. bei zuvor positivem Befund negativ zu werden.

Außerdem zeigten Patientinnen mit HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- positiven Tumoren einen Trend zu einem längeren rezidivfreien Intervall.

Insbesondere bei Topoisomerase IIα-FISH positiven Tumoren zeigte sich ein Trend zu einem längeren Gesamtüberleben.

5.1 Methoden der HER-2/neu und Topoisomerase IIα Bestimmung und deren Auswertung

5.1.1 HER-2/neu Bestimmung

Im Hinblick auf die am besten etablierte Methode der HER-2/neu Bestimmung herrscht derzeit keine einheitliche Meinung.
In den meisten Kliniken wird die einfache und kostengünstige Methode der immunhistochemischen Färbung angewandt. Vorteile hierbei sind, dass die gefärbten Gewebeproben noch am gleichen Tag und auch mehrfach aufeinander folgend lichtmikroskopisch begutachtet werden können. Anfällig ist diese Methode jedoch im Hinblick auf eine mangelnde Anfärbung; also falsch-negative Ergebnisse bei zu lange archiviertem paraffineingebettetem Gewebe. Eine zu lange Lagerungszeit führt zu einem signifikanten Intensitätsverlust der Immunfärbung *(Jacobs et al 1996)*. Die Gewebefixation kann ebenfalls einen Einfluss auf die Anfärbung der Gewebeschnitte haben. So haben zum Beispiel verschiedene Antikörper unterschiedliche Färbemuster, je nachdem wie die Zellen fixiert wurden *(Penault-Llorca et al 1994)*. Zur genaueren und am besten objektivierbaren Bestimmung wird daher die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung („FISH“) empfohlen *(Bartlett et al 2003, Kakar et al 2000, Riou et al 2001)*. Hierbei wird das zu bestimmende Gen mittels einer fluoreszierenden Sonde direkt im Zellkern der Karzinomzelle dargestellt und die entsprechende Gen-Kopie als einzelnes Signal gewertet. Der Test mittels FISH wird positiv gewertet, d.h. eine Amplifikation liegt vor, wenn pro Tumorzelle das Verhältnis von Anzahl der Kopien des HER-2/neu- Gens zur Anzahl der Kopien des Chromosoms 17 größer oder gleich 2 ist. Allerdings besteht bei dieser Methode ein weitaus höherer Kostenaufwand und es ist eine manuelle Zählung nötig, um die Anzahl der Genkopien beurteilen zu können.
Bei der derzeit gängigen klinischen HER-2/neu Bestimmung beim Mammakarzinom sollten daher standardisierte immunhistochemische Tests eingesetzt werden, um eine Behandlung mit dem humanisierten Antikörper Herceptin™ anwenden zu können. Diese Tests weisen den HER-2/neu Membranrezeptor nach und klassifizieren das Tumorgewebe mittels eines Scores von „0“ bis „3+“. Bei einem Score von „3+“ besteht zu über 95% eine Genamplifkation des HER-2/neu Gens auf Chromosom 17. Bei einem Score von „0“ und „1+“ besteht zu 95% keine

Genamplifikation. Bei einem Score von „2+“ sind hingegen nur 25% Gen-amplifiziert. Deshalb wird in der Klinik empfohlen, bei Tumorgewebe, an dem der Score „2+“ ermittelt wurde, eine Kontrolle mit der FISH Methode durchzuführen. Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten sollten auch bei der FISH Analyse standardisierte Sondenkits verwendet werden. In unserer Studie haben wir das Tumorgewebe von allen Patientinnen mit beiden Methoden getestet. In der immunhistochemischen Färbung mittels des CB11 Antikörpers zeigte sich mit 31% positiv getesteter Fälle ein repräsentatives Ergebnis, welches auch mit der derzeit gängigen Literatur übereinstimmt *(Chearskul et al 2001, Lebeau et al 2001)*.

Anders hingegen verhielt es sich mit der FISH Methode. Wir verwendeten den standardisierten PathVysion™ HER-2 DNA Sondenkit. Es zeigte sich jedoch in unserer Studie lediglich bei 14,6% eine HER-2/neu- Amplifikation, was im Vergleich zur gängigen Literatur, bei der von einer HER-2/neu Positivität von ca. 20% ausgegangen wird, einer geringen Anzahl entspricht *(Pauletti et al 2000, Owens et al 2004).* Vor allem in der stark positiven „3+“ Gruppe bestand nur in 44% der Fälle eine Amplifikation. Erklärbar ist dies damit, dass es vor allem technische Probleme mit dem teilweise schon sehr alten Tumorgewebe gab. Zu lange Lagerzeiten führen wie oben beschrieben zu einem schwächeren Färbeergebnis. Pauletti et al berichteten jedoch auch darüber, dass die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vom HER-2/neu Gen und der in unmittelbarer Nachbarschaft gelegener Gene zu einer Proteinüberexpression ohne Amplifikation der Gene im Zellkern selbst führt. Im Vergleich von HER-2/neu- Überexpression in der Immunhistochemie und HER-2/neu- Amplifikation in der FISH Bestimmung zeigte sich in unserer Studie eine Übereinstimmung von 62%. Eine 95%- prozentige Übereinstimmung konnten wir nicht nachweisen.

Die in anderen Studien gezeigte Korrelation von HER-2/neu Status zu Tumorgröße, tumorhistologischen Parametern und dem Hormonrezeptorstatus *(Slamon et al 1987, Konecny et al 2003, Taucher et al 2003, Huang et al 2005)* konnten wir ebenfalls nicht nachweisen. Zurückzuführen ist dies am ehesten auf die geringe Fallzahl unserer Studie.

Das Vorkommen von DTZ-KM ist ein Prognosefaktor, der mit einem verkürzten Gesamtüberleben einhergeht *(Braun et al 2003).* Es könnte daher ein positiver oder negativer HER-2/neu Status ebenfalls im Zusammenhang mit der Präsenz von DTZ-KM stehen. In unserer Studie zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen einem positiven HER-2/neu Status in der immunhistochemischen Färbung und dem Vorhandensein von DTZ-KM. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits zuvor von Schindlbeck et al 2005 und 2004 gezeigt werden. Allerdings konnte Schindlbeck, wie auch Naume 2001, einen positiven Trend zwischen einer HER-2/neu- Amplifikation in der FISH Färbung und den DTZ-KM zeigen. Diesen Zusammenhang konnten wir nicht nachweisen. Zurückzuführen ist dies wiederum am ehesten auf technische Probleme und möglicherweise nicht ausreichende Qualität der Tumorschnitte in unserer Studie.

Es wurde schon mehrfach beschrieben, dass eine HER-2/neu-Überexpression/Amplifikation oftmals auch mit einer Topoisomerase IIα-Überexpression/Amplifikation einhergeht. Diese Koamplifikation soll maßgeblich verantwortlich für ein besseres Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapeutika bei HER-2/neu positiven Fällen sein. Eine derartige Koamplifikation konnten wir in unseren Untersuchungen nachweisen. Mit einem p von 0.01 zwischen HER-2/neu FISH und Topoisomerase IIα Immunhistochemie, und einem p von <0.01 zwischen HER-2/neu FISH und Topoisomerase IIα FISH bestand eine eindeutige Korrelation einer HER-2/neu- Amplifikation mit einer Topoisomerase IIα- Überexpression/Amplifikation.

5.1.2 Topoisomerase IIα Bestimmung

Im Hinblick auf Topoisomerase IIα gibt es bisher noch kein standardisiertes Verfahren zur Markierung und Interpretation einer Topoisomerase IIα Überexpression, wie es mittels Immunhistochemie und FISH Färbung beim HER-2/neu Status der Fall ist. Deswegen variieren die Ergebnisse einer Positivität zwischen 10,6% und 32% *(Depowski et al 2000, Hellemans et al 1995, Jarvinen et al 1996)*. Wir setzten bei der immunhistochemischen Färbung in unserem Kollektiv eine Positivität voraus, wenn mindestens 50% der Zellen stark angefärbt waren. In unserer Untersuchung waren demnach 25% der Fälle in der immunhistochemischen Färbung positiv, was mit der derzeit gängigen Literatur übereinstimmt.
In der FISH Färbung wurden wie bei der HER-2/neu Bestimmung die Anzahl der Topoisomerase IIα Genkopien im Verhältnis zum Chromosom 17 gesetzt und bei einem Verhältnis größer gleich 2 als positiv bewertet. Hierbei zeigten nur 5 von 47 Fälle, also 11%, eine Amplifikation. Es zeigte sich keine Deletion. Wie Tanner et al 2006 beschrieben haben, zeigte sich auch bei unserer Studie nur eine Topoisomerase IIα- Amplifikation bei einer gleichzeitigen HER-2/neu- Amplifikation. 5 der 7 HER-2/neu amplifizierten Fälle waren ebenfalls Topoisomerase IIα amplifiziert, es bestand eine Koamplifikation von 71%. Auch ältere Studien zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich einer Koamplifikation *(Durbecq et al 2003, Jarvinen et al 1999)*.
Im Vergleich beider Methoden konnte mit einem p von 0.06 kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Topoisomerase IIα- Überexpression in der immunhistochemischen Färbung und einer Topoisomerase IIα- Amplifikation in der FISH Färbung gezeigt werden. Hierbei ist wiederum anzuführen, dass es keine standardisierte Methode zur imunhistochemischen Topoisomerase IIα Bestimmung gibt.
Im Hinblick auf eine Korrelation der Topoisomerase IIα- Überexpression/Amplifikation zur Tumorgröße und tumorhistologischen Parametern bestand mit einem p von 0.03 ein Zusammenhang zwischen Topoisomerase IIα positiven Tumoren in der immunhistochemischen Färbung mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus. In der FISH Färbung bestand kein Zusammenhang. Alle anderen tumorhistologischen Faktoren standen in keinem Zusammenhang mit Topoisomerase IIα. Ebenso bestand kein Zusammenhang zu dem Auftreten von DTZ-KM. Wie bereits zuvor bei der HER-2/neu Bestimmung sind hierbei wiederum technische Probleme, zu lange

Lagerzeiten und zu geringe Fallzahlen möglicherweise ausschlaggebend dafür, dass keine Zusammenhänge gezeigt werden konnten.

5.2 Anthrazyklinhaltige Chemotherapie und deren Einfluss auf HER-2/ neu und Topoisomerase IIα positive Tumore

HER-2/neu ist ein unabhängiger Prognosefaktor beim primären Mammakarzinom. Bisher haben viele Studien gezeigt *(Ross und Fletcher, 1998 und 2003*), dass Patientinnen mit einem positiven HER-2/neu Status des Primärtumors eine schlechtere Prognose haben, da im weiteren Krankheitsverlauf ein erhöhtes Rezidivrisiko und ein kürzeres Gesamtüberleben besteht. Ein positiver Topoisomerase IIα Status wird ebenfalls als ein negativer Prognosefaktor angesehen *(Depowski et al 2000)*. In der im Jahre 1999 bisher größten veröffentlichen Studie von Rudolph et al wurde Tumorgewebe von 942 Patientinnen untersucht und gezeigt, dass Patientinnen mit positivem Topoisomerase IIα Status ein verkürztes metastasenfreies Übeleben und auch ein verkürztes Gesamtüberleben haben *(Rudolph et al 1999)*.

Weitere etablierte Prognosefatoren sind Tumorgröße, Grading, Lymphknotenbefall und Hormonrezeptorstatus. Alle diese Faktoren haben einen Einfluss auf das rezidiv- und fernmetastasenfreie Überleben und auf das Gesamtüberleben. In unserer Studie hatten Patientinnen mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus ein längeres fernmetastasenfreies Überleben, was möglicherweise durch eine besseres Ansprechen auf eine anthrazyklinhalktige Chemotherapie in diesem Hochrisikokollektiv zu erklären ist. Im Gegensatz dazu hatten alle anderen Faktoren keinen Einfluss auf das Überleben. Gründe hierfür sind wiederum zu kleine Fallzahlen und die Heterogenität der Gruppe.

Um Patientinnen mit schlechten Prognosefaktoren dennoch eine optimale Therapie zu gewährleisten, müssen bei bestimmten Voraussetzungen, individuell angepasste Chemotherapien eingesetzt werden, um einen Behandlungserfolg zu erzielen. Sogenannte prädiktive Faktoren sollen eine Einteilung ermöglichen und einen Therapieerfolg voraussagen. So konnte Vogel et al 2002 zeigen, dass bei HER-2/neu- positiven Primärtumoren ein besseres Ansprechen des Antikörpers Trastuzumab (Herceptin™) besteht. Auch sprechen hormonrezeptornegative Tumoren besser auf eine neoadjuvante Chemotherapie an *(Gianni et al 2002, Untch et al 2002).* Es können sich jedoch auch in Abhängigkeit von tumorbiologischen Faktoren des Primärtumors Unterschiede im Ansprechen auf systemische

Chemotherapien in bestimmten Patientengruppen zeigen. Levine et al haben 1998 und erneut 2005 gezeigt, dass Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie ein längeres rezidivfreies Intervall und ein längeres Gesamtüberleben haben *(Levine et al 1998, Levine et al 2005).*

Bisher wurde in einigen Studien über einen Trend zum besseren Ansprechen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie bei HER-2/neu- positiven Tumoren berichtet *(De Laurentiis et al 2001, Di Leo et al 2001, Di Leo et al 2002, Moliterni et al 2003, Paik et al 2000, Pritchard et al 2002*). Einen signifikanten Zusammenhang konnte nur Paik et al 1998 herstellen *(Paik et al 1998).* Eine aktuelle Studie an 639 Patientinnen zeigte ein signifikant besseres Ansprechen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie bei HER-2/neu- positiven Tumoren. Es zeigte sich ein längeres rezidivfreies Intervall sowie ein längeres Gesamtüberleben *(Pritchard et al 2006).* Im Gegensatz dazu konnten Pegram et al bei der Untersuchung von vier Brustkrebszelllinien kein besseres Ansprechen von Anthrazyklinen bei HER-2/neu- Überexpression nachweisen *(Pegram et al 1997)*. Zum gleichen Ergebnis kamen Konecny et al 2001. In ihren in vitro Untersuchungen an Brustkrebszellen konnte kein verbessertes Ansprechen von FEC gegenüber CMF bei HER-2/neu- Überexpression nachgewiesen werden *(Konecny et al 2001)*. Daher muss die Überlegung angestellt werden, ob eine bessere Ansprechrate bei HER-2/neu- positiven Tumoren in Abhängigkeit eines anderen Faktors steht. In unmittelbarerer Nachbarschaft zum HER-2/neu Gen auf dem langen Arm von Chromosom 17 befindet sich das Topoisomerase IIα Gen. Topoisomerase IIα ist eines von 5 bisher entdeckten Topoisomerase Enzymen, welche bei der DNA Replikation, Transkription, Rekombination, Kondensation und Segregation mit der DNA Doppelhelix in Verbindung stehen und somit eine tragende Rolle spielen *(Wang 2002).* Topoisomerase IIα ist unter anderem beteiligt bei der Entspiralisierung der DNA Doppelhelix und bei der Segregation der Chromosome während der Anaphase. Direkt bei der DNA- Transkription bricht es eine Öffnung durch einen DNA Strang um einem zweiten Doppelstrang eine Verbindung zu ermöglichen *(Cortes et al 2003)*. Topoisomerase ist daher ein Hauptangriffsziel vieler antimitotischer und antiproliferativer Medikamente. Derartige Medikamente heißen Topoisomeraseinhibitoren. Die in der Klinik am meisten eingesetzten Vertreter dieser Medikamentengruppe speziell gegen Brustkrebs sind die Anthrazykline. In einer 2005 veröffentlichten klinischen randomisierten Studien konnte gezeigt werden, dass

eine Amplifikation oder eine Deletion von Topoisomerase IIα prädiktiv für ein besseres Ansprechen anthrazyklinhaltige Chemotherapie ist. In dieser Studie hatten Patientinnen mit einer Amplifikation oder Deletion des Topoisomerase IIα- Gens ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall, wenn sie anders als in der Vergleichsgruppe mit Anthrazyklinen behandelt wurden *(Knoop et al 2005)*.

Tanner et al konnten 2006 zeigen, dass der ausschlaggebende Punkt eines guten Ansprechens auf Anthrazykline vor allem eine Koamplifikation von HER-2/neu und Topoisomerase IIα ist. Patientinnen mit einer Koamplifikation von HER-2/neu und Topoisomerase IIα profitierten klar von einer adjuvanten anthrazyklinhaltigen „high dose"- Therapie gegenüber einer CMF- haltigen Chemotherapie.

Wir testeten in unserer Studie ebenfalls, ob Patientinnen mit einer Überexpression oder Amplifikation von HER-2/neu und Topoisomerase IIα ein verbessertes Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie aufweisen konnten. Wie in den zuvor beschriebenen Studienergebnissen hatten auch in unserem Kollektiv Patientinnen mit HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- positiven Tumoren einen Trend zum längerem rezidivfreien Intervall und Gesamtüberleben. Dies kann mit einem besseren Ansprechen auf die verabreichte anthrazyklinhaltige Chemotherapie erklärt werden.

Keines dieser Ergebnisse war jedoch signifikant nachweisbar. Erklärbar ist dies damit, dass unser Kollektiv eine zu geringe Fallzahl hatte und insgesamt zu heterogen war. Alle unsere Patientinnen hatten einen positiven Lymphknotenstatus, 54% hatten einen G3 Tumor, 65% waren östrogenrezeptornegativ, zusammengefasst bestanden durchgehend schlechte Prognosefaktoren. Man muss demnach von einem Kollektiv mit insgesamt überdurchschnittlich schlechter Prognose ausgehen.

Um den prädiktiven Wert von Topoisomerase IIα im Bezug auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie zu zeigen, untersuchten einige Autoren Patientinnen, die eine primäre oder neoadjuvanten Chemotherapie erhielten. Coon et al konnte an 35 Patientinnen, die eine neoadjuvante anthrazyklinhaltige Chemotherapie erhielten, zeigen, dass die Patientinnen mit positiven Topoisomerase IIα Tumoren ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie aufwiesen (*Coon et al 2002)*. Die gleichen Ergebnisse hatte McGrogan et al an 125 *(MacGrogan et al 2003)* und Park et al an 67 Patientinnen *(Park et al 2003)* nachgewiesen. In unserem Kollektiv erhielten 7 Patientinnen eine primäre Chemotherapie. Auch hier wiederum bemerkenswert war,

dass die einzige Patientin aus dieser Gruppe, die nach 4 Jahren Nachbeobachtungszeit noch lebte und kein Rezidiv hatte, einen positiven HER-2/neu und Topoisomerase IIα Tumor hatte. Man könnte also durchaus die Überlegung anstellen, dass ein verbessertes Ansprechen der neoadjuvanten Chemotherapie bei Topoisomerase IIα Positivität besteht. Um dies jedoch eindeutig zu belegen, müsste eine größere Fallzahl untersucht werden.

5.3 Disseminierte Tumorzellen in Blut und Knochenmark

Eine mögliche Hauptursache der hohen Mortalitätsrate solider epithelialer Tumoren ist die Disseminierung vitaler maligner Zellen ins Blut und Knochenmark. Vor allem beim Mammakarzinom findet diese Dissemination an einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung statt und nimmt somit einen entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung. Die meisten Patientinnen erhalten deshalb zur Elimination der disseminierten Zellen eine systemische Chemotherapie, um ein Rezidiv zu verhindern. Oftmals treten jedoch Rezidive trotz adäquater Therapie auf. Es ist daher besonders wichtig, diese disseminierten Tumorzellen, die sich dem Einfluss der Chemotherapie entziehen, aufzufinden und zu charakterisieren, um so eine Prognose stellen zu können, entsprechende Therapien einzusetzen und den Effekt der Therapien zu beobachten.

Gegenstand vieler Studien sind daher die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM).

Patientinnen mit DTZ-KM haben größere Tumore, ein schlechteres Tumorgrading, eher Lymphknotenmetastasen und haben eher Hormonrezeptor negative Tumore. So geht das Vorhandensein von DTZ-KM zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einem verkürzten rezidiv- und fernmetastasenfreien Intervall einher, sowie mit einem verkürzten Gesamtüberleben. Zusammengefasst haben Patientinnen mit DTZ-KM eine schlechtere Prognose gegenüber den Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkstatus *(Braun et al 2000b, Braun et al 2005, Diel et al 1996, Gebauer et al 2001, Gerber et al 2001, Mansi et al 1999, Pierga et al 2004, Wiedswang et al 2003, Wong et al 2003)*.

Aber nicht nur bei Diagnosestellung weisen DTZ-KM auf eine schlechte Prognose hin. In mehreren Studien wurde gezeigt, das trotz einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie ca. 15% der Zellen weiterhin im Knochenmark persistieren. Diese Zellen scheinen unempfindlich gegenüber der Chemotherapie zu sein und ihre Persistenz geht mit einem deutlich schlechteren Krankheitsverlauf einher *(Braun et al 2000a, Janni et al 2005, Wiedswang et al 2004)*.

In unserer Studie konnte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Persistieren der DTZ-KM nach abgeschlossener systemischen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie und einem verkürzten rezidivfreien Überleben bzw. verkürztem

Gesamtüberleben herstellen. Erklären lässt sich dieser Zustand am ehesten mit der Heterogenität unseres Kollektives.

Braun et al 2000a, Janni et al 2005, Wiedswang et al 2004 kamen in ihren Studien zu dem Ergebnis, dass eine antiproliferative systemische Chemotherapien nicht auf alle DTZ-KM einen Einfluss haben. Denn in ihren Studien zeigte eine gewisse Anzahl der Patientinnen eine Verminderung oder einen kompletten Rückgang der DTZ-KM nach der Chemotherapie. Jedoch zeigte im Gegensatz dazu ein ähnlicher Prozentsatz einen positiven Knochenmarksbefund im Anschluss an die Chemotherapie, bei anfänglichem negativ getestetem Knochenmark.

Dieser zum Teil mangelnde Einfluss antiproliferativer Chemotherapie lässt sich damit erklären, dass die DTZ-KM keine proliferierenden Zellen sind, sondern sich in einem Art „Ruhezustand"- im Stadium der G0 Phase des Zellzyklus befinden *(Meng et al 2004).* Pantel et al konnte 1993 diesen Ruhezustand an dem niedrigen Proliferationsmarker KI 67 der DTZ-KM zeigen. DTZ-KM sind demnach also ruhende Zellen, die erst im weiteren Krankheitsverlauf ab einem unbestimmten Zeitpunkt erneut proliferieren und zur Progression führen.

Auch in unserer Studie scheint sich der mangelnden Einfluss antiproliferativer Chemotherapie auf die DTZ-KM nachzuweisen.

Bei 24% der Patientinnen traten vor Beginn der Chemotherapie DTZ-KM auf. Nach Abschluss der Therapie traten bei 31% der Patientinnen DTZ-KM auf. 9% der Patientinnen wurden nach der Chemotherapie negativ getestet, die zuvor positiv waren. Allerdings zeigten 17% einen positiven Befund nach systemischer Chemotherapie bei anfänglich unauffälligem Knochenmark.

Der Rückgang der DTZ-KM nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie stand statistisch nicht im signifikantem Zusammenhang mit dem HER-2/neu und dem Topoisomerase IIα Status des Primärtumors. Der prädiktive Voraussagewert von HER-2/neu im Bezug auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie, der in Kapitel 5.2 diskutiert wurde, zeigte keinen Einfluss auf die Knochenmarkszellen. Jedoch zeigte sich bei Patientinnen mit HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- positiven Tumoren ein Trend zum Verbleiben eines negativen Knochenmarkstatus. Diese Patientinnen wechselten auch eher von einem anfänglich positiven Knochenmarksbefund zu einem negativen Status. Bei keiner der in der FISH Färbung auf Topoisomerase IIα positiv getesteten Patientinnen konnten in der zweiten Knochenmarksuntersuchung, nach dem Verabreichen der anthrazyklinhaltigen Chemotherapie disseminierte

Tumorzellen nachgewiesen werden. Unsere Studie war die bisher erste, die einen möglichen Zusammenhang von Topoisomerase IIα und dem Auftreten von DTZ-KM nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie untersuchte. Die Ergebnisse zeigen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Sie könnten aber die Basis für weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Fällen sein.

Eine weitere Überlegung war ob eine positiver HER-2/neu Status des Primärtumors in Verbindung mit dem Vorkommen von DTZ-KM steht.

Ein solcher Zusammenhang konnte bisher noch nicht gezeigt werden *(Schindlbeck et al 2004)*. Allerdings konnte Schindlbeck et al 2005 in seiner Studie einen Trend nachweisen, in der eine HER-2/neu- Amplifikation in der FISH mit einem positiven Knochenmarksbefund einhergeht. Wir konnten in unserer Studie allerdings keinen Einfluss auf das Vorkommen von DTZ-KM bei positivem HER-2/ neu Rezeptor des Primärtumors erkennen.

Da die DTZ-KM ruhende Zellen sind und deshalb eine antiproliferative Chemotherapie oftmals unwirksam ist, müssen andere Therapieformen zur Behandlung dieser Zellen erstellt werden. Vielversprechend hierbei erscheinen Therapien, die auf zielgerichteten Antikörpern basieren. So gehört die spezifische Antikörpertherapie mit dem monoclonalen Antikörper Herceptin™ (Trastuzumab) der sich gegen das HER-2/neu Onkoprotein richtet, heutzutage zu einem festen Bestandteil der adjuvanten und palliativen Therapie beim HER-2/neu positiven Mammakarzinom. Der Einsatz von Herceptin™ führt zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens von Patientinnen mit metastasiertem HER-2/neu positivem Primärtumor *(Slamon et al 2001, Vogel et al 2001)*. Auch in der großen HERA und NSABP-B31/NCCTG N9831 Studie, konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, die eine zusätzliche adjuvante Antikörpertherapie mit Herceptin™ erhielten, einen großen Vorteil davon hatten *(Piccart-Gebhardt et al 2005, Ramond et al 2005)*.

Um eine zielgerichtete Antikörpertherapie gegen die DTZ-KM durchführen zu können, müssen die DTZ-KM direkt auf mögliche Angriffspunkte untersucht werden. In neueren Studien werden die DTZ-KM deshalb direkt auf eine HER-2/neu Positivität untersucht und mit der HER-2/neu Positivität des Primärtumors verglichen *(Becker et al 2005, Solomayer et al 2006, Vincent-Salomon et al 2007).* In diesen Studien zeigte sich, dass bei einigen Patientinnen ein positiver HER-2/neu Status der DTZ-KM

gegenüber einem negativem HER-2/neu Status des Primärtumors vorlag. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Patientinnen trotz ihres HER-2/neu negativen Primärtumors nicht trotzdem von einer Antikörpertherapie mit Herceptin™ profitieren würden.

Dass eine zielgerichtete Antikörpertherapie gegen Tumorantigene auf den DTZ-KM eine wirksame Therapieform ist, konnte bereits 1999 von Braun et al gezeigt werden. Er konnte zeigen, dass eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A (Edrecolomab) gegen das epitheliale Zell Adhäsions Molekül (EpCAM) zu einer deutlichen Verminderung von Cytokeratin positiven Zellen im Knochenmark führte. Um eine Verbesserung der Elimination von DTZ-KM zu erzielen und somit auch ein längeres Gesamtüberleben zu gewährleisten, untersuchte Kasimir-Bauer et al 2003 die DT-KM ebenfalls auf HER-2/neu und EpCAM (17-1A). Auch bei ihr hatten einige Patientinnen mit HER-2/neu negativem Primärtumor, HER-2/neu positive DTZ-KM. Allerdings hatten auch einige Patientinnen bei positivem EpCAM und HER-2/neu Status des Primtumors negative DTZ-KM. Da jedoch Patientinnen mit einem positiven HER-2/neu Primärtumor eine Therapie mit Herceptin™ erhalten und dies erwiesenermaßen eine bessere Prognose mit sich bringt, müssen eben genau die Patientinnen gefunden werden, die eventuell trotz eines negativen HER-2/neu Primtumors von einer Therapie mit Herceptin™ profitieren, weil sie HER2 positive DTZ-KM haben. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass außer dem prognostischen Wert des Vorkommens von DTZ-KM vor allem auch ihr prädiktiver Voraussagewert von Bedeutung sein könnte. Die Charakterisierung der DTZ-KM vor allem im Bezug auf „Second Line“ Therapien wie die Immunotherapie, nimmt einen wichtiger Stellenwert in der derzeitigen Forschung ein.

Aber nicht nur im Knochenmark finden sich disseminierte Tumorzellen. Zirkulierende Tumorzellen im Blut (CTC) können bei allen Patienten mit einem primären oder metastasierten Tumorleiden gefunden werden *(Beitsch et al 2000, Fehm et al 2002, Gafario et al 2003, Austrup et al 2000).* Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lassen sich diese Zellen mittels RT-PCR auf Zytokeratin-19-positive Zellen nachweisen *(Stathopoulou et al 2002)*. In dieser Studie führte ein Vokommen von CTCs zu einem verkürzten rezidivfreien Intervall.. Auch beim metastasierten Mammakarzinom konnte mittels RT-PCR Zytokeratin-19 mRNA nachgewiesen werden *(Smith et al 2000)*. Die veränderte Anzahl von CTCs nach systemische Chemotherapie kann als

Therapieansprechen gewertet werden. 68% der Patientinnen zeigten nach 25 Chemotherapiezyklen sowohl eine Veränderung des klinischen Verlaufs, als auch des CTCs Status *(Smith et 2000)*. Das Vorhandensein von CTCs beim lokalen und metastasierten Mammakarzinom führt zu einem verkürzten Gesamtüberleben *(Cristofanilli et al 2004, Cristofanilli et al 2005, Xenidis et al 2006*). Cristofanilli konnte in seiner Studie zeigen, dass mehr als 5 CTCs in 7,5 ml des Gesamtblutes mit einem deutlich verkürzten Gesamtüberleben einhergehen. Die prognostische Bedeutung des Vorkommens von CTCs vor dem Beginn einer adjuvanten Chemotherapie wirft wichtige Fragen im Bezug auf die biologischen Eigenschaften dieser Zellen auf. Denn sie könnten möglicherweise der Grund für eine Therapieresistenz dieser Zellen gegenüber einer Chemotherapie sein. Meng et al untersuchte 2004 die Eigenschaften der CTCs bezüglich HER-2/neu und im Vergleich dazu den HER-2/neu Status des Primärtumors bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Dabei konnte er zeigen, dass eine gewisse Anzahl der Patientinnen mit HER-2/neu negativem Primärtumor CTCs mit positivem HER-2 Status zeigten, und dass die Amplifikation des HER-2/Gens sich erst im weiteren Verlauf mit der weiteren Progression der Grunderkrankung einstellt. Diesen Patientinnen mit HER-2/neu positiven CTCs wurde Herceptin™ verabreicht, und es stellte sich bei einer Patientin eine komplette Remission ein. Bisher ging man davon aus, dass bei HER-2/neu negativen Primärtumoren eine Therapie mit Herceptin™ keinen Nutzen hat, da die Metastasen der Patientinnen ebenfalls HER-2/neu negativ sein würden. Meng et al gehen aber davon aus, dass nicht wie bisher angenommen der Primärtumor ausschlaggebend bezüglich einer HER-2/ neu Amplifikation ist, sondern dass mit zunehmender Progression der Erkrankung auch die Amplifikation von HER-2/neu zunimmt. Somit sollten im weiteren Verlauf der Erkrankung wiederholte Untersuchungen des Blutes auf CTCs erfolgen, um Patientinnen mit positiven CTCs dann eine Antiköpertherapie zu verabreichen.

Die Entwicklung zur zielgerichteten Tumortherapie weist einen neuen Therapieansatz in der Krebstherapie auf. Er ist eine Alternative zur unspezifischen Abtötung aller Tumorzellen durch die systemische Chemotherapie, die am Beginn der Erkrankung steht. Vor allem im Rezidivstadium sollte es in Zukunft eine zielgerichtete Therapie geben, die es dem Onkologen ermöglicht, optimal ausgerichtet auf die Eigenschaften des Tumors zu therapieren. Abgesehen von Herceptin™ gibt es diesbezüglich auch andere spezifische Antikörper wie zum Beispiel Bevacizumab und Lapatinib, die neue Therapieansätze versprechen.

Lapatinib, ein sogenanntes small molecule, inhibiert die intrazelluläre Tyrosinkinase von EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) und HER-2/neu und wird deshalb ebenso wie Herceptin™ bei HER-2/neu positiven Tumoren eingesetzt. Da Lapatinib intrazellulär wirkt vermutet man eine Überlegenheit von Lapatinib gegenüber Trastuzumab bei Tumoren, bei denen die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu Proteins fehlt *(Xia et al 2004)*. Eine randomisierte Phase III Studie konnte zeigen, dass Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und HER-2/neu positivem Tumor, die zuvor alle mit Herceptin™ behandelt wurden, ein längeres progressionsfreies Intervall hatten, wenn sie zusätzlich mit Lapatinib behandelt wurden *(Geyer et al 2006)*. Aufgrund der kleinen Molekülgröße kann Lapatinib die Blut-Hirn-Schranke passieren und könnte auch bei Hirnmetastasen wirken *(Lin et al 2006)*. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Gabe von Lapatinib zu Trastuzumab ein besseres Ansprechen hat und gleichzeitig auch weniger Nebenwirkungen aufweist *(Storniolo et al 2005)*. In einer Studie mit neoadjuvanter Therapie beim inflammatorischen Mammakarzinom konnte Cristofanilli 2006 ein deutlich besseres Ansprechen bei Kombination von Lapatinib und Paclitaxel feststellen.

Neben Lapatinib gehört Bevacizumab zu den neueren zielgerichteten Therapiemöglichkeiten beim primären Mammakarzinom. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper. Er bindet an den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), einem Wachstumsfaktor der Gefäßneubildung. Bevacizumab hemmt direkt die Tumorangiogenese *(Kim et al 1993)*. In einer Studie mit 722 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konnte in Kombination mit Paclitaxel ein signifikant besseres Ansprechen mit einem längeren Progressionsfreien Intervall gezeigt werden, sowie einen Trend zum längeren Gesamtüberleben *(Miller et al 2005)*.

Zukünftige Aufgabe wird es sein, weitere prädiktive und prognostische Faktoren von Primärtumoren, Metastasen, oder disseminierten Tumorzellen in Blut und Knochenmark zu finden, um so die Patienten für bestimmte Therapien einzuteilen, sie zu individualisieren und die beste Therapie mit den wenigsten Nebenwirkungen zu erzielen. Die Ergebnisse dieser hier präsentierten Arbeit könnten Grundlagen für weitere Untersuchungen der Primärtumoren oder disseminierten Tumorzellen zur Individualisierung und Verbesserung der prognostischen und prädiktiven Aussage und daran orientierten Therapien sein.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Vorkommen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ist ein unabhängiger Prognosefaktor in allen Stadien der Erkrankung und weist auf einen schlechten Krankheitsverlauf hin.
HER-2/neu ist ebenfalls ein Prognosefaktor, der einen aggressiveren Krankheitsverlauf mit verkürztem Überleben anzeigt. In unmittelbarer Nachbarschaft des HER-2/neu Gens auf Chromosom 17 liegt das Gen der Topoisomerase IIα, ein Schlüsselenzym der DNA Replikation. Auch Topoisomerase IIα ist ein Prognosefaktor, der mit einem kürzeren Rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben einhergeht.
In neueren Studien werden HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- positiven Tumoren ein besseres Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie zugesprochen. Wir untersuchten deshalb, ob eine Überexpression bzw. Amplifikation der beiden Faktoren tatsächlich ein besseres Ansprechen vorhersagt. Als ein besseres Ansprechen wurde das Auftreten eines prognostisch vorteilhaften negativen Knochenmarksbefundes und ein längeres Überleben angesehen.

Dazu wurden Tumorschnitte von einem Kollektiv von 54 nodal positiven Mammakarzinompatientinnen mittels immunhistochemischer Färbung und einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridsierung untersucht, um so eine HER-2/neu- oder Topoisomerase IIα- Amplifikation oder Expression nachzuweisen. Alle Patientinnen erhielten vor und nach einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie eine Knochenmarkspunktion. Folgende Ergebnisse konnten gewonnen werden: In der immunhistochemischen Färbung zeigten 31% eine HER-2/neu- Überexpression, in der FISH Färbung waren 14,6% amplifiziert.
25% der Fälle zeigten in der immunhistochemischen Färbung eine Topoisomerase IIα- Überexpression, 11% waren amplifiziert. Es zeigte sich nur eine Topoisomerase IIα Amplifikation, wenn gleichzeitig eine HER-2/neu Amplifikation vorlag.
24% der Patientinnen wiesen vor der Chemotherapie disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auf. Bei 31% persistierten die Tumorzellen weiterhin nach der Chemotherapie. Bei den Patientinnen mit einer HER-2/neu- Überexpression zeigte sich der Trend, einen negativen Knochenmarksbefund beizubehalten oder zu bekommen. Mit einem p von 0.16 zeigte sich dieser Trend ebenso bei den

Topoisomerase IIα überexprimierten Tumoren. Im Bezug auf das Überleben zeigten HER-2/neu- positive Tumoren mit einem p von 0,16 einen Trend zum längeren rezidivfreien Überleben. Dieser Trend ließ sich auch bei Topoisomerase IIα- positiven Tumoren zeigen (p=0.09). Im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das metastasenfreie Überleben konnten wir zeigen, dass alle Patientinnen, die eine Topoisomerase IIα Amplifikation hatten, zum Zeitpunkt der Studie noch lebten (p=0.19) und keine Fernmetastasen hatten (p=0.099). Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 44 Monaten konnte sich jedoch keiner dieser Zusammenhänge als statistisch signifikant nachweisen lassen.

Zusammengefasst scheint eine HER-2/neu- und Topoisomerase IIα- Positivität den Erfolg einer anthrazyklinhaltige Chemotherapie zu begünstigen, indem ein längeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben zu beobachten ist. Ebenso scheint eine Überexpression/ Amplifikation und anschließende anthrazyklinhaltige Chemotherapie einen Effekt auf DTZ-KM zu haben. Die prognostische Bedeutung von DTZ-KM und der prädiktive Voraussagewert von HER-2/neu und Topoisomerase IIα könnten helfen, Patientinnen in verschiedene Untergruppen einzuteilen und somit die Vorraussetzung erbringen, optimale Therapiekonzepte zu erstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten als Grundlagen für weitere Untersuchungen der Primärtumoren oder disseminierten Tumorzellen zur Individualisierung und Verbesserung der prognostischen und prädiktiven Aussage und daran orientierten Therapien sein.

Gegenstand der Forschung sind mittlerweile viele solcher spezifischer Therapieoptionen gegen Oberflächenproteine oder bestimmte Wachstumsfaktoren. All diese Untersuchungen werden in Zukunft helfen können prädiktive und prognostische Faktoren zu erstellen, um Patientinnen individuell zu behandeln und eine bestmögliche Therapie mit wenig Nebenwirkung zu erzielen.

7 Literaturverzeichnis

Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland-Häufigkeit und Trends. 2004, 4. überarbeitete Auflage. Saarbrücken

Armstrong K, Eisen A; Weber B, Assessing the risk of breast cancer. N Engl J Med 2000, 342: 564-571.

Austrup F, Uciechowsky P, Eder C, Böckmann B, Suchy B, Driesel G, Jäckel S, Kusiak I, Grill HJ, Giesing M, Prognostic value of genomic alterations in minimal residual cancer cells purified from the blood of breast cancer patients. Br J Cancer 2000, 83: 1664-1673.

Bartlett J., Mallon E, Cooke T, The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? J Pathol 2003, 199: 411-417.

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelson J, Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenocrafts. Cancer Res 1998, 58: 2825-2831.

Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF, HER2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. Anticancer Res 2005, 25: 2171-21716.

Beitsch PD, Clifford E, Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients. Am J Surg 2000, 180: 444-449.

Blanks RG, Moss SM, Mcgahan CE, Quinn MJ, Babb PJ, Effect of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1900-8 comparison of observed with predicted mortality. BMJ 2000, 321: 665-669.

Braun S, Hepp F, Kentenich C, Janni W, Pantel K, Riethmüller G, Willgeroth F, Sommer H, Monoclonal antibody therapy with Edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytoceratin-positive tumor cells in bone marrow. Clin Cancer Res 1999, 5: 3999-4004.

Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K, Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. J Clin Oncol 2000a, 18: 80-86.

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G, Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N Engl J Med 2000b, 342: 525-533.

Braun S, Vogl FD, Schlimok G, Diel IJ, Janni W, Gerber B, Gebauer G, Coombes RC, Pierga J-Y, Naume B, Pantel K, Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastasis: 10-year survival of 4199 breast cancer patients. Presentation, 2003, 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K, A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med 2005, 353: 793-802.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ, Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. N Engl J Med 2003, 348: 1625-1638.

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D´Antonio A, Bianco AR, De Placido S, C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. J Clin Oncol 1996, 14: 2702-2708.

Chearskul S, Onreabroi S, Churintrapun M, Semprasert N, Bhothisuwan K, Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in primary breast cancer. Asian Pac J Allergy Immunol 2001, 19: 197-205.

Clark GM, Prognostic and predictive factors: Diseases of Breast, Edited by Jay R. Harris, Marc E Lippmann, Monica Morrow, Samuel Hellman. Lippincott-Raven Publishers, 1996, Philadelphia.

Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD, Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. Clin Cancer Res 2002, 8: 1061-1067.

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulazziz Z, Mac Donald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY, Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes). J Histochem Cytochem 1984, 32: 219-229.

Cortes F, Pastor N, Mateos S, Dominguez I, Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. Mutat Res 2003, 543: 59-66.

Cox DR, Regression models and life tables. J R Stat Soc B 1972, 34:187-220.

Cristofanilli M, Budd T, Ellis M, Stopeck A, Matera J, Miller C, Reuben J, Doyle G, Allard J, Terstappen L, Hayes D, Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004, 351: 781-791.

Cristofanilli M, Hayes D, Budd T, Ellis M, Stopeck A, Reuben J, Doyle G Matera J, Allard J, Miller C, Fritsche H, Hortobagyi G, Terstappen L, Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2005, 23: 1420-1430.

Cristofanilli M, Boussen H, Baselga J, Lluch A, Ben Ayed F, Friaha M et al, A phase II combination study of lapatinib and paclitaxel as a neoadjuvant therapy in patients with newly diagnosed inflammatory breast cancer (IBC). Breast Cancer Res Treat 2006, 100 (Suppl 1), S5 (abstract 1).

Depowski PL, Rosenthal SI, BrienTP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS, Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. Mod Pathol 2000, 13: 542-547.

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G, Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary breast surgery: prognostic value in comparison with nodal status. J Natl Cancer Inst 1996, 88: 1652-1658.

Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, Dolci S, Leroy JY, Paesmans M, Isola J, Piccart MJ, HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. Clin Cancer Res 2002, 8: 1107-1116.

Durbecq V, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Leroy JY, Piccart M, Larsimont D, Comparison of topoisomerase-IIalpha gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. Breast Cancer Res Treat 2003, 77: 199-204.

Early Breast Cancer Trialists´ Collaborative Group, Multi-agent chemotherapy for early breast cancer. Cochrane Database Syst Rev 2002, 1:CD000487.

Early Breast Cancer Trialists´ Collaborative Group, Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005, 365: 1687-1717.

Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cusaac A, Janicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M, Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1 and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. J Clin Oncol 2001, 19: 3808-3816.

Engel J, Eckel R, Kerr J, Schmidt M, Fürstenberger G, Richter R, Sauer H, Senn HJ, Hölzel D, The process of metastasisation. Eur J Cancer 2003, 39: 1794-1806.

Funke I, Eiermann J, Engel J, Harbeck, Janni W, Lebeau A, Permanetter W, Rack B, Untch M, Wolg C, Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. Manual Mammakarzinom, Tumorzentrum München, 2005.

Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J, Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. Clin Caner Res 2002, 8: 2073-2084.

Ferley J, Bray F, Sankila R, Parkin D. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 2.0. IARC Press, 2004, Lyon.

Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Duenas R, Lozano A, Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. Int J Cancer 2003, 107: 984-990.

Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W, Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. J Clin Oncol 2001, 19: 3669-3674.

Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K, Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in Lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. J Clin Oncol 2001, 19: 960-971.

Geyer CE, Forster JM, Lindquist D, Chan S, Romieu G, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D, Lapatinib plus Capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2006, 355: 2733-2743.

Goldhirsch A, Gelbe RD, Simens RJ, Glasiou P, Coates AS, Costs and benefits of adjuvant therapy in breast cancer: a quality-adjusted survival analysis. J Clin Oncol 1989, 1: 36-44.

Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Garcia-Conde J, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G, for the ECTO Study Group. First report of the EUROPEAN Cooperative Trial in operable breast cancer (ETCO). Effects of primary systemic therapy (PST) on local-regional disease. 2002, Proc ASCO 21:34a, abstr #132.

Hellemans P, van Dam PA, Geyskens M, van Oosterom AT, Buytaert P, Van Marck E, Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha expression in primary ductal carcinoma of the breast. J Clin Pathol 1995, 48: 147-150.

Holbro T, Civenni G, Hynes NE, The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res 2003, 284: 99-110.

Holinski-Feder E, Brandau O, Nestle-Krämling C, Derakhshandeh-Peykar P, Murken J, Untch M, Meindl A, Genetik des Mammakarzinoms-Grundlagen-Forschung-Diagnostik. Dtsch Ärztebl 1998, 95: 600-605.

Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, Berteloot P, Amant F, Vergote I, Christiansens MG, Hormone receptors do not predict the HER2/neu status in all age groups of women with an operable breast cancer. Ann Oncol 2005, 16: 1755-61.

Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schmitt SJ, Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. J Natl Cancer Inst 1996, 88: 1054-1059.

Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kentenich C, Strobl B, Schindlbeck C, Hantschmann P, Sommer H, Pantel K, Braun S, The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. Cancer 2001, 92: 46-53.

Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer K, Pantel K, Gerber B, Friese K, Persistence of isolated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for cancer. Cancer 2005, 103 (5). 884-891.

Jarvinen TA, Kononen J, Pelto-Huikko M, Isola J, Expression of topoisomerase IIalpha is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer. Am J Pathol 1996, 148: 2073-2082.

Jarvinen TA, Liu ET, HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2003, 78: 299-311.

Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J, Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1999, 26: 142-150.

Jarvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Barlund M, Borg A, Grenman S, Isola J, Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. Am J Pathol 2000, 156: 839-847.

Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML, HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. Mol Diagn 2000, 5: 199-207.

Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958, 53: 457-481.

Kasimir-Bauer S, Otterbach F, Oberhoff C, Schmid KW, Kimmig R, Seeber S, Rare expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases. Int J Mol Med 2003, 12: 969-975.

Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U, Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. normal tissues. Europ J Cancer Clin Oncol 1987, 23: 137-147.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzeboc P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ, International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. J. Clin Oncol 2003, 21: 2600-2608.

Kim KS, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Phillips HS, Ferrara N, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 1993, 362: 809-820.

Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdottir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlertsen B, Danish Breast Cancer Cooperative Group, Retrospective analysis of Topoisomerase IIα amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. J Clin Oncol 2005, 23: 7483-90.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang, HJ, Beryt M, Seshadi R, Hepp H, Slamon DJ, Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 2003, 95: 142-153.

Lawlo DA, Smith GD, Ebrahim S, Hyperinsulinaemia and increased risk of breast cancer. finding from the British women´s heart and health study. Cancer Causes Control 2004, 15: 267-275.

Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Lohrs U, Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. J. Clin Oncol 2001, 19: 354-363.

Lebeau A, Högel B, Nähring J, Permanetter W, Pathomorphologie des Mammakarzinoms. Manual Mammakarzinom, Tumorzentrum München, 2005.

Lin NU, Carey LA, Liu MC, Younger J, Come SE, Bullitt E, Van Den Abbeele AD, Li X, Hochberg FH, Winer EP, Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with HER2+ breast cancer. J Clin Oncol (Meeting Abstracts) 2006, 24: 503.

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW, Circulating tumor cells in patents with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res 2004, 10: 8152-8162.

Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen L, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J, HER-2 gene amplifikation can be acquired as beast cancer progress, Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101: 9393-9398.

MacGrogan G, Rudolph P, Mascarel I, Mauriac L, Durand M, Avril A, Dilhuydy JM, Robert J, Mathoulin-Pelissier S, Picot V, Floquet A, Sierankowski G, Coindre JM, 2003. DNA topoisomerase IIalpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer. Br J Cancer 2003, 89: 666-671.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC, Outcome of primary breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. Lancet 1999, 354: 197-202.

Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS, Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2005, 23: 792-799.

National Cancer Institute, Ries L, Eisner M, Kosary C, Hankey B, Miller B et al., 2004. SEER cancer statistics review 1975-2000.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM, HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immuniohistochemistry in a cohort of 65566 breast cancer tissues. Clin Breast Cancer 2004, 5: 63-69.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G, Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. J. Natl Cancer Inst 1993, 85: 1419-1424.

Park K, Kim J, Lim S, Han S, Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. Eur J Cancer 2003, 39,:631-634.

Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ, 2000. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. J. Clin Oncol 2000, 18: 3651-3664.

Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ, The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer. Oncogene 1997,15: 537-47.

Penault-Llorca F, Adelaide J, Houvenaeghel G, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J. Optimisation of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation. J Pathol 1994, 173: 65-75.

Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG, Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. Br.J Cancer 1977, 35: 1-39.

Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelenat H, Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. Clin Cancer Res 2004, 10: 1392-1400.

Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ, Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 rezeptor and DNA-reactive drugs. Oncogene 1998, 17: 2235-2249.

Priccart-Gebhardt MJ: First result of the HERA trial. Session Advances in monoclonal antibody therapy for breast cancer (scientific symposium), ASCO-Meeting, 13-15 May 2005, Orlando Florida.

Pritchard K, Shepard L, O´Malley F, Andrulis I, Tu D, Bramwell V, Levine M, HER2 and Responsiveness of Breast Cancer to adjuvant Chemotherapy. N. Engl J. Med 2006, 354: 2103-2111.

Ramond E, Joint analysis of NSABP-B-31 and NCCTG-N9831: Session Advances in monoclonal antibody therapy for breast cancer (scientific symposium), ASCO-Meeting, 13-15 May 2005, Orlando Florida.

Riede Ursus-Nikolaus, Martin Werner, Schaefer Hans Eckart, Allgemeine und spezielle Pathologie. 2004. Georg Thieme Verlag, 5 überarbeitete Auflage.

Riou G, Mathieu MC, Barrois M, Le Bihan ML, Ahomadegbe JC, Benard J, Le MG, C-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast-cancer patients. Int J Cancer 2001, 95: 266-270.

Robert -Koch-Institut, 2005. Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie - Dachdokumentation Krebs.

Ross JS, Fletcher JA, The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Stem Cells 1998, 16: 413-428.

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. Oncologist 2003, 8: 307-325.

Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, De M I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R, Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. Breast Cancer Res Treat 1999, 55: 61-71.

Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, Fernö M, Parwaresch R, Alm P, Correlation between p53, c-erbB-2, and Topoisomerase IIa expression, DNA Ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. J. Pathol 1999, 187: 207-216.

Schindlbeck C, Janni W., Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K, Comparative Analysis Between the HER2 Status in Primary Breast Cancer Tissue and the Detection of Isolated Tumor Cells in the Bone Marrow. Breast Cancer Res Treat 2004, 87: 65-74.

Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Friese K, Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. Breast cancer Res 2005, 7: 1174-1185.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mcguire WL, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Sience 1987, 235: 177-182.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001, 344: 783-792.

Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Krämer B, Vogel U, Neubauer H, Wallwiener D, Huober J, Fehm T, Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2006, 98: 179-184.

Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC, Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. J Clin Oncol 2000, 18: 1432-1439.

Smith-Warner SA, Spiegelmann D, Yaun S-S, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ, Alcohol and breast cancer in women. A pooled analysis of cohort studies. JAMA 1998, 279: 535-540.

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis CH, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulias V et al, Molecular detection of cytoceratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. J Clin Oncol 2002, 20: 3404-3412.

Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr Omary M, Bodenmueller H, Bonfrer H, Brundell J, Einarsson R, Erkandsson A, Johansson A, Leca JF, Levi M, Meier T, Nap M, Nustad K, Seguin P, Sjoedin A, Sundstroem B, van Dalen A, Wiebelhaus E, Wiklund B, Aerlestig L, Hilgers J, Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 workshop. Tumor Biol 1998, 19: 123-152.

Stosiek P, Kasper M, Karsten U, Goertchen R, Detection of cancer metastases in regional lymph nodes: Comparative histological and immunhistological investigations with a broad-range anticytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3. Neoplasma 1991, 38: 43-47.

Storniolo AM, Burris HA III, Overmoyer B, Silverman P, Pegram MD, Jones SF, Peacock NW, Loftiss J, Koch KM, Paul E, Ho PTC, A phase I, open label study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of lapanitib (GW572016) in combination with trastuzumab. Breast Cancer Res Treat, 2005, 94 (Suppl.1)abstract 1073.

Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lethinen P, Malmström P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J, Topoisomerase IIα Gene Amplifikation Predicts Favorable treatment Response to Tailored and Dose-Escalated Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy in HER-2/neu-Amplified Breast Cancer. Scandinavian Breast Group Trial 9401. J Clin Oncol 2006, 24: 2428-2436.

Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Dubsky P, Bachleitner T, Roka S, Fitzal F, Kandioler D, Spom E, Friedl J, Mittblock M, Jakesz R, Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinomas? Cancer, 2003, 98: 2547-53.

Untch M, Konecney G, Ditsch N, Sorokina Y, Moebus V, Muck B, Kuhn W, Bastert G Werner CH, Thomssen Ch, Wallwiener D, Albert U, Bothmann G, Kreienberg R, Lück HJ, Dose-dense sequential epirubicin-paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: results of a randomised AGO study. Proc ASCO 2002, 21: 34a, abstr #133

Vincent-Salomon A, Pierga JY, Couturier J, d' Enghien CD, Nos C, Sigal-Zafrani B, Lae M, Freneaux P, Dieras V, Thiery JP, Sastre-Garau X, HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? Br J Can 2007, 96: 654-659.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, First-line, single-agent Herceptin® (trastuzumab) in metastatic breast cancer: a preliminary report. Eur J Cancer 2001, 37: 25-27.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M, Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002, 20: 719-726.

Wang JC, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol 2002, 3: 430-440.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B, Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. Clin Cancer Res 2004, 10: 5342-5348.

Wiendswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume BDetection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor of breast cancer. J Clin Oncol 2003, 21: 3469-3478.

Wong GYC, Yu QQ, Osborne MP, Bone marrow micrometastases is a significant predictor of long-term relapse-free survival for breast cancer by non-proportional hazards model. Breast Cancer Res Treat 2003, 82: Suppl 1: S99. abstract

Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou E, Stathopoulos S, Georgoulias V, Mavroudis D, Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node -negative breast cancer patients. J Clin Oncol 2006, 24: 3756-3762.

Xia W, Liu L H, Ho P, Spector NL, Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. Oncogene 2004, 23: 646-653.

Yarden Y, Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology 2001, 61 Suppl 2, 1-13.

8. Anhang

8.1 Verzeichnis Abbildungen

Abbildung 1: HER-2/neu Onkoprotein **8**

Abbildung 2: Topoisomerase IIα **10**

Abbildung 3: Topoisomerase IIα Färbung **20**

Abbildung 4: HER-2/neu Färbung **22**

Abbildung 5: FISH Färbung HER-2/neu, Topoisomerase IIα **26**

Abbildung 6: Angefärbte Tumorzelle **33**

Abbildung 7: Verteilung der HER-2/neu- Überexpression vs. keine keine Überexpression **38**

Abbildung 8: Verteilung der HER-2/neu-Amplifikation vs. keine Amplifikation **39**

Abbildung 9: Verteilung der Topoisomerase IIα- Überexpression vs. keine Überexpression **42**

Abbildung 10: Verteilung Topoisomerase IIα- Amplifikation vs. keine Amplifikation **43**

Abbildung 11: Vorkommen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark vor und nach anthrazyklinhaltige Chemotherapie **48**

Abbildung 12: Rezidive **50**

Abbildung 13: Kaplan-Meier Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus **51**

Abbildung 14: Kaplan-Meier Analyse des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von HER-2/neu FISH **52**

Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse des rezidivfreien Überlebens in Abhängkeit von Topoisomerase IIα FISH **53**

Abbildung 16: Kaplan-Meier Analyse des fernmetastasenfreien Überlebens in Abhängigkeit von Topoisomerase IIα FISH **54**

Abbildung 17: Gesamtüberleben **56**

Abbildung 18: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von Topoisomerase IIα FISH **57**

Abbildung 19: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit HER-2/neu FISH **58**

Abbildung 20: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark **60**

8.2 Verzeichnis Tabellen

Tabelle	**1:**	Charakterisierung der Patientinnen	**37**
Tabelle	**2:**	Vergleich zwischen HER-2/neu FISH und HER-2/neu IHC	**40**
Tabelle	**3:**	Korrelation der HER-2/neu- Überexpression mit den tumor-biologischen Faktoren	**41**
Tabelle	**4:**	Dako-HercepTest-Score	**21**
Tabelle	**5:**	Vergleich zwischen TOPO IIα IHC und TOPO IIα FISH	**44**
Tabelle	**6:**	Korrelation von TOPO IIα- Überexpression mit den tumor-biologischen Faktoren	**45**
Tabelle	**7:**	Korrelation HER-2/neu IHC/FISH mit TOPO IIα IHC/FISH	**46**
Tabelle	**8:**	Knochenmarkbefund vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in Korrelation mit HER-2/neu und TOPO IIα	**49**

8.3 Verzeichnis Abkürzungen

IHC	Immunhistochemie
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
TOPO IIα	Topoisomerase IIα
HER-2/neu	HER-2/neu Onkoprotein
ITZ-KM	isolierte Tumorzellen im Knochenmark
DTZ-KM	disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit so tatkräftig unterstützt haben:

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. med. H. Sommer für die freundliche Überlassung dieses Themas, sowie für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und Anregungen bei der Korrektur.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. Christian Schindlbeck für seine sehr engagierte, sachkundige und umfassende Dissertationsbetreuung. Er zeigte unermüdliches Engagement in der Unterstützung meiner Arbeit und war mir jederzeit mit Rat und Tat behilflich.

Außerdem danke ich dem Team des Labors für Tumorimmunologie der I. Frauenklinik für die freundliche und geduldige Hilfe bei der Durchführung der Gewebeanalysen.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit.

Für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit danke ich abschließend Evelyn Hauenstein und Michael Cannarile.

8.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Familiename:	Kornmeier
Vorname:	Anke
Geburtsdatum:	29.07.1977
Geburtsort:	Offenburg
Anschrift:	Hirschberstraße 20 A,
	80634 München
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1988 – 1997	Schiller – Gymnasium Offenburg
1984 – 1988	Grundschule Fessenbach

Studium der Humanmedizin:

06/2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2004-03/2005	III. PJ-Tertial: Chirurgie, Starchip Children´s Health, Auckland, Neuseeland
08/2004-/11/2004	II. PJ-Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Starnberg
04/2004-08/2004	I. PJ-Tertial: Innere Medizin, Klinikum Schwabing, München
03/2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998 – 2000	Medizinstudium an der LMU München, Vorklinik

Berufliche Tätigkeit:

Seit 08/2007	Assistenzärztin Nephrologie, Klinikum Harlaching, München
11/2005	Assistenzärztin Zentrale Notaufnahme, Klinikum Schwabing, München

Promotion:

Seit 2002	Thema: „HER2 und Topoisomerase IIα-Expression und Amplifikation des Mamma-Karzinoms- Einfluss auf das Ansprechen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie sowie Präsenz Isolierter Tumorzellen im Knochenmark (ITZ-KM).“ I. Frauenklinik des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Anke Kornmeier

München, Juni 2008