

Aus dem Rotkreuzklinikum München - Frauenklinik
Vorstand: Prof. Dr. W. Eiermann

**HER-2/neu, Topoisomerase-II- α , Östrogen- und
Progesteronrezeptor: Vergleich des Expressions- und
Amplifikationsverhaltens zwischen Primärtumor und
Lymphknotenmetastase des Mammakarzinoms**

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

vorgelegt von
Daniela Gologan, geb. Michler

aus
Münster

Jahr
2009

Aus dem Rotkreuzklinikum München - Frauenklinik
Vorstand: Prof. Dr. W. Eiermann

**HER-2/neu, Topoisomerase-II- α , Östrogen- und
Progesteronrezeptor: Vergleich des Expressions- und
Amplifikationsverhaltens zwischen Primärtumor und
Lymphknotenmetastase des Mammakarzinoms**

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

vorgelegt von
Daniela Gologan, geb. Michler

aus
Münster

Jahr
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. J. Schendel
Prof. Dr. C. Buske

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. W. Eiermann
Dr. med. B. Ataseven
Dr. med. B. Högel
Dr. med. M. Beer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc. M. Reiser,
FACR, FRCR.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 03. 2009



Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

B. Ataseven, D. Michler, B. Hoegel, M. Beer, W. Eiermann

Evaluation of Estrogen and Progesterone receptor, HER-2 and Topo-II- α in primary breast cancer and metastatic axillary lymph nodes

European Journal of Cancer, Volume 5, No. 3, September 2007, 10-21

Beyhan Ataseven MD, Daniela Michler, Bernhard Hoegel, Michaela Beer and Wolfgang Eiermann

Evaluation of Estrogen and Progesterone receptor, HER-2 and Topo-II- α in primary breast cancer and metastatic axillary lymph nodes

Posterpräsentation auf dem Deutschen Krebskongress 2008 - Berlin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Definition	1
1.2	Problematik: Grundlagen zur Therapieentscheidung.....	2
2	Grundlagen	4
2.1	Pathomorphologie des Mammakarzinoms.....	4
2.1.1	Nicht invasive Karzinome	4
2.1.2	Invasive Karzinome	5
2.1.3	Prognosefaktoren	7
2.1.4	Prädiktive Faktoren.....	12
2.2	Therapie des Mammakarzinoms	16
2.2.1	Primär systemische Therapie	17
2.2.2	Operative Therapie.....	17
2.2.3	Adjuvante Therapie	18
2.3	Färbemethoden und Detektionssysteme in der Pathologie	22
2.3.1	Immunhistochemie	22
2.3.2	Nukleinsäureassays	24
3	Patientinnen und Methodik.....	27
3.1	Datenerhebung.....	27
3.2	Einschlusskriterien.....	27
3.3	Herstellung des Untersuchungsmaterials	28
3.4	Immunhistochemie.....	30
3.4.1	Bestimmung von Estrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) und Topoisomerase-II- α	30
3.4.2	Bestimmung des HER-2/neu-Rezeptors.....	32
3.5	in situ Hybridisierung	34
3.5.1	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	34
3.5.2	Chromogene in situ Hybridisierung (CISH).....	37
3.5.3	Mikroskoppausrüstung:	39
3.6	Statistische Methoden	40

4	Ergebnisse	42
4.1	Tumorgrading	43
4.2	Altersverteilung.....	43
4.3	Histologischer Tumortyp.....	44
4.4	HER-2/neu.....	45
4.4.1	HercepTest (Immunhistologie).....	45
4.4.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	48
4.4.3	Chromogene in situ Hybridisierung (CISH).....	50
4.5	Topoisomerase-II- α	51
4.5.1	Immunhistochemie	51
4.5.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	52
4.5.3	Chromogene in situ Hybridisierung (CISH).....	53
4.6	Östrogenrezeptor (ER)	54
4.7	Progesteronrezeptor (PR).....	56
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung.....	66
7	Abbildungsverzeichnis	68
8	Diagrammverzeichnis	69
9	Tabellenverzeichnis	70
10	Literaturverzeichnis	71
11	Danksagung	87
12	Lebenslauf.....	88

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Definition

Diagnose Brustkrebs! Diese Diagnose betrifft jährlich über eine Million Frauen weltweit. In Deutschland ist das Mammakarzinom mit 26,8% der häufigste bösartige Tumor der Frau, gefolgt vom kolorektalen Karzinom (17,4%), Bronchialkarzinom (6,1%), Malignomen des Uterus (5,5%) und der Ovarien (4,8%) [3, 24]. Etwa jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Allerdings ist die Krebsinzidenz auf nationaler Ebene nur ein geschätzter Wert, da in Deutschland noch keine absolute, flächendeckende Registrierung existiert [23]. Das Robert-Koch-Institut und die Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister geben 424.250 Krebsneuerkrankungsfälle für das Jahr 2002 an, davon 206.000 Frauen. Für das Mammakarzinom wurde die Zahl der Neuerkrankungen deutscher Frauen im Jahr 2002 auf 55.150 geschätzt [3]. 1998 waren es noch 46.295 Frauen [23] und 1985 lag die Zahl der Neuerkrankungen bei nur ca. 22.000 [6]. Diese starke Zunahme ist unter anderem Ergebnis der stetig steigenden durchschnittlichen Lebensdauer, da das Alter den größten Risikofaktor darstellt. Auch der zunehmende Einfluss von mutagenen und karzinogenen Faktoren auf die Menschen spielt dabei eine vermutlich große Rolle. Durch den vermehrten Einsatz bestimmter diagnostischer Verfahren wie dem Mammographie-Screening kann die Diagnose des Brustkrebses wesentlich früher gestellt werden. Somit nimmt die Anzahl der Frühstadien einen immer größeren Anteil der Gesamtzahl an Neuerkrankungen ein. [3]

Unter dem Begriff „Brustkrebs“ oder „Mammakarzinom“ werden unterschiedliche Krankheitsbilder zusammengefasst. Diese sind zwar alle primär in der Brust lokalisiert, jedoch kann durch Metastasierung eine Ausbreitung über den gesamten Körper stattfinden. Außerdem können die Tumore sehr unterschiedliche biologische Verhaltensmuster aufweisen, die aus einer Reihe molekulargenetischer Ereignisse entstehen, nämlich aus der Aktivierung von Onkogenen und der Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen. Dies resultiert in der Dysfunktion oder gänzlichen Inhibition von für die Reparatur und Stabilität der DNA verantwortlichen Proteine [58]. Wie der Primärtumor, so ist auch sein Metastasierungsverhalten von Patientin zu Patientin unterschiedlich.

1.2 Problematik: Grundlagen zur Therapieentscheidung

Sowohl die hohe Inzidenz des Mammakarzinoms, als auch die Vielfältigkeit seines Erscheinungsbildes machen die Wichtigkeit seiner genauen Erforschung deutlich. Therapie und Prognose stützen sich immer stärker auf histopathologische Faktoren, die im Tumorgewebe durch die pathohistologische Aufarbeitung nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem sowohl das HER-2/neu-Gen als auch die Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Aber auch die Topoisomerase-II- α rückt diesbezüglich immer weiter in den Vordergrund. Diese Parameter sind die therapeutischen Zielpunkte für z.B. Antikörper (Trastuzumab), antihormonelle Medikamente (z.B. Tamoxifen, Aromataseinhibitoren) und spezielle Chemotherapeutika (z.B. Anthrazykline) [46] und dadurch wichtige Faktoren für die Vorhersage des Erfolges [59]. Ihre Bestimmung, sowie die Bestimmung fast aller biologischen Marker, wird üblicherweise am Tumormaterial des Primärtumors durchgeführt. Die Marker-Bestimmung der Metastasen ist momentan kein Standardverfahren. Allerdings besteht das Hauptziel der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms in der Bekämpfung der Metastasen, welche sich biologisch und pathologisch vom Primärtumor unterscheiden könnten. Oft entstehen Metastasen erst einige Jahre nach der Primäroperation des Tumors; trotzdem basiert die dann folgende Therapie auf den Merkmalen des Primärtumors. Folglich besteht die Annahme, dass sich der biologische und histopathologische Charakter während des Metastasierungsprozesses nicht verändert.

Im Falle unterschiedlicher Verhaltensmuster zwischen Primärtumor und Metastase würde dies eine enorme Einschränkung der Wirksamkeit der Therapie bedeuten. Eine Patientin mit einem HER-2/neu-negativen Primärtumor, aber HER-2/neu-positiven Metastasen wird derzeit nicht mit Trastuzumab, einem gegen den HER-2/neu-Rezeptor gerichteten monoklonalen Antikörper, behandelt, obwohl sie einen ganz entscheidenden Vorteil davon hätte. Umgekehrt würde eine Patientin, deren Primärtumor HER-2/neu positiv war, eine Trastuzumab-Therapie erfahren, obwohl die später entdeckten Metastasen womöglich HER-2/neu-negativ sind und die Therapie somit keinerlei Nutzen für die Patientin hätte. Dieselbe Problematik ergibt sich mit allen anderen biologischen Markern, also auch mit den Hormonrezeptoren und der Topoisomerase-II- α . Patientinnen würden fälschlicherweise mit

Antikörpern, antihormonellen Medikamenten oder Anthrazyklinen behandelt werden, hätten jedoch keinen Nutzen davon, sondern nur die -oft kardialen- Nebenwirkungen, die insbesondere bei den anthrazyklinbasierten Therapien nicht zu vernachlässigen sind [64]. Aus Gründen der Nutzen-Risiko-Abwägung ist es notwendig zu untersuchen, ob das Expressionsverhalten der biologischen Marker im Primärtumor auch dem der Metastase entspricht. Sollte dies der Fall sein, und somit den Ergebnissen von Tanner et al. (2001) und Durbecq et al. (2003) entsprechen [17, 92], kann das bisherige Verfahren bestätigt werden. Wäre aber der Status der einzelnen Marker in den Metastasen nicht identisch mit dem Status des Primärtumors, könnten viele Patientinnen in Zukunft besser und erfolgreicher therapiert werden als bisher.

In dieser Arbeit wird anhand des formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Tumorgewebes von 121 Patientinnen untersucht, ob das Expressionsverhalten der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie das Expressions- und Amplifikationsverhalten des HER-2/neu- und Topoisomerase-II- α -Gens von Primärtumor und ipsilateralen, axillären Lymphknotenmetastasen konkordant ist.

2 Grundlagen

2.1 Pathomorphologie des Mammakarzinoms

Grundsätzlich wird das invasive vom nicht invasiven Karzinom unterschieden. Letzteres wird durch den Erhalt einer intakten Basalmembran und somit fehlender Stromainvasion definiert.

2.1.1 Nicht invasive Karzinome

Die nicht-invasiven Karzinome werden auch als in situ Karzinome bezeichnet. Zwei verschiedene Typen lassen sich unterscheiden: Das duktales carcinoma in situ (DCIS) und das zur Kategorie der lobulären Neoplasie zählende lobuläre carcinoma in situ (CLIS). [50]

Lobuläre Neoplasie

In der aktuellen Fassung der WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma wurde der Begriff der lobulären Neoplasie eingeführt. Unter diesem Begriff wird das gesamte Spektrum atypischer Epithelproliferationen verstanden, die aus terminalen duktulo-lobulären Einheiten abstammen und durch die Proliferation von zumeist kleinen und oft lockeren kohäsiven Zellen charakterisiert werden. Der Begriff lobuläre Neoplasie ist somit eine Zusammenfassung der atypischen lobulären Hyperplasie (ALH) und des lobulären Carcinoma in situ (CLIS) [103] und stellt 1 – 3% aller Mammakarzinome dar [102, 35]. Da das CLIS nur selten zu Kalzifikationen führt und deswegen nicht tastbar ist, wird es meist als Zufallsbefund bei der Abklärung anderer Auffälligkeiten der Brust entdeckt. Nachfolgende, sich daraus entwickelnde invasive Karzinome treten mit einem relativen Risiko von 6,9 – 12 im Vergleich zu Frauen ohne lobuläre Neoplasie auf [2, 36]. Die lobuläre Neoplasie stellt zwar einen Risikofaktor, jedoch keine obligatorische Präkanzerose, für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms, sowohl der ipsilateralen als auch der kontralateralen Brust dar. Das nachfolgende invasive Karzinom kann sowohl vom lobulären als auch vom ductalen Typus sein. [103]

Duktales carcinoma in situ, DCIS

Die WHO definiert das intraduktale Karzinom als eine neoplastische intraductale Läsion, die durch eine erhöhte epitheliale Proliferation charakterisiert ist [103]. Zwar ist der exakte natürliche Verlauf des DCIS nur begrenzt bekannt, aber man weiß heute, dass das DCIS eine präkanzeröse Läsion darstellt. Sollte es unbehandelt bleiben, kann sich daraus mit einem relativen Risiko von 8-11 ein invasives Karzinom vom duktalem Typ entwickeln [103].

In den letzten Jahren wurde die Diagnose der in situ Karzinome der weiblichen Brust vermehrt gestellt. Der Grund dafür sind die verbesserten und regelmäßigen Früherkennungsmaßnahmen, die die intraduktalen Karzinome mit mammo-graphisch darstellbaren Kalzifikationen (70-95%) detektieren [22].

2.1.2 Invasive Karzinome

Invasive Karzinome werden nach den Vorgaben der Aktuellen WHO-Klassifikation histologisch typisiert [103]. Unter der Vielzahl der in Tabelle 1 aufgelisteten invasiven Karzinome ist das invasiv-ductale mit 65-80% das am häufigsten vorkommende. Dieser Tumortyp ist als „not otherwise specified“ ein Karzinom, das keiner der anderen Kategorien zugeordnet werden kann und in über 50% seiner Masse ein nicht-spezialisiertes Muster zeigt [59].

Am zweithäufigsten tritt das invasiv-lobuläre Karzinom mit 6-15% auf, gefolgt von den medullären Karzinomen (3%). Einen nachweislich günstigeren Verlauf mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von ungefähr 95% nehmen das tubuläre (1-15%), papilläre (1-7%) und muzinöse (1-2%) Karzinom [20, 25, 48, 59]. Die restlichen Karzinomformen treten in einer Häufigkeit von weniger als 1% auf und werden hier nicht gesondert beschrieben.

Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (NOS)

- gemischter Typ
- pleomorphes Karzinom
- Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
- Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
- Karzinom mit melanotischen Merkmalen

Invasives lobuläres Karzinom

Tubuläres Karzinom

Invasives kribriiformes Karzinom

Medulläres Karzinom

Muzinöses Karzinom und andere muzinreiche Tumoren

- muzinöses Karzinom
- Zystadenokarzinom und zylindereelliges muzinöses Karzinom
- Siegelringzell-Karzinom

Neuroendokrine Tumoren

- solides neuroendokrines Karzinom
- atypischer Carcinoidtumor
- kleinzelliges Karzinom
- großzelliges neuroendokrines Karzinom

Invasives papilläres Karzinom

Invasives mikropapilläres Karzinom

Apokrines Karzinom

Metaplastische Karzinome

- rein epitheliale metaplastische Karzinome
 - Plattenepithelkarzinom
 - Adenokarzinom mit Spindelzell-Metaplasie
 - Adenosquamöses Karzinom
 - Mukoepidermoides Karzinom
- gemischtes epithelial-/mesenchymales metaplastisches Karzinom

Lipidreiches Karzinom

Sekretorisches Karzinom

Onkozytäres Karzinom

Adenoid-zystisches Karzinom

Azinuszell-Karzinom

Glykogenreiches Klarzellkarzinom

Sebazeöses Karzinom

Inflammatorisches Karzinom

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome [103]

2.1.3 Prognosefaktoren

Mit dem Ziel, den Krankheitsverlauf jeder Patientin in Bezug auf Rezidiv- und Metastasierungsrisiko individuell möglichst genau abschätzen zu können, stützt man sich auf gewisse Prognosefaktoren. Diese sind zum Zeitpunkt der Diagnose verfügbar und betreffen den Verlauf der Erkrankung ohne zusätzliche Therapiemaßnahmen. Laut den Consensus-Statements der AGO 2007 [1], St. Gallen 2007 [32], NIH 2001 [63] und der American Association of Clinical Oncology (ASCO 2007) [37] beinhalten diese das Ausbreitungsstadium eines Tumors, welches in Form der TNM-Klassifikation angegeben wird, das Wachstumsmuster, bestehend aus histopathologischem Typ und Grading, und den Steroidhormonrezeptorstatus. Der Einbruch in Blut- oder Lymphgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin. Noch nicht endgültig geklärt ist die unabhängige prognostische Relevanz einer HER-2/neu Überexpression [37]. Aufgrund ihrer Bedeutung werden die Prognosefaktoren im Folgenden kurz erläutert.

2.1.3.1 TNM-Klassifikation

Der (derzeit) aussagekräftigste Prognosefaktor beim Mammakarzinom ist nach wie vor der axilläre Lymphknotenstatus. Das Rezidiv- bzw. Mortalitätsrisiko korreliert direkt mit der Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten. So beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate bei negativen Axillar-Lymphknoten 72-80 %, bei 1-3 positiven Lymphknoten 38-63 % und bei mehr als 4 befallenen Lymphknoten nur noch 13-27 % [9]. Um eine pathologische Klassifikation der regionären Lymphknoten durchführen zu können, müssen mindestens die Lymphknoten von Level I und II reseziert werden [59]. Laut Carter et al. (1989) steht auch die Tumorgöße in direkter Verbindung mit dem Gesamtüberleben [9].

Stadieneinteilungen haben den Sinn, klinische und prognostische Kriterien für die Auswahl der geeigneten Therapie zu gewinnen. Außerdem lassen sich so verschiedene Behandlungsarten miteinander vergleichen.

Für solide Tumoren hat sich die weltweit einheitliche TNM-Klassifikation durchgesetzt. Sie unterliegt ständiger Bearbeitung und wird den neuesten

klinischen Erkenntnissen laufend angepasst. Die letzte Aktualisierung der derzeit gültigen TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgte zuletzt 2002 [96].

T...bedeutet Größe des Tumors und seine Beziehung zur Umgebung

N...bezeichnet das Ausmaß des regionalen Lymphknotenbefalls

M...gibt an, ob Fernmetastasen vorliegen

Im klinischen Alltag dominiert bei überwiegend primär operativem Vorgehen die pathologische postoperative pTNM – Klassifikation (Tabelle 2). Der Zusatz (sn) sollte beigefügt werden, wenn die pN-Klassifikation alleine auf dem Ergebnis einer Sentinellymphknoten-Biopsie beruht [59].

pT – Primärtumor

pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Microinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1b	Mehr als 0,5 cm, aber maximal 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Mehr als 1 cm, aber maximal 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, maximal 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausbreitung auf Brustwand oder Haut
pT4a	Mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

pN – Regionäre Lymphknoten

pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1mi	Mikrometastasen (größer als 0,2 mm, maximal 2 mm groß)
pN1	
pN1a	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN1b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
pN1c	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A.mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren
pN2	
pN2a	Metastasen in 4-9 ipsilateralen Lymphknoten, zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung
pN2b	Metastasen in klinisch auffälligen ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Fehlen axillärer Lymphknotenmetastasen.
pN3	
pN3a	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einem positiven axillären Lymphknoten; oder in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die durch Sentinellympnknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber klinisch nicht auffällig waren
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten .

pM – Fernmetastasen

pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms [96]

2.1.3.2 Histologisches Grading

Die Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome wird als histologisches Grading bezeichnet. Angewandt wird das von Bloom and Richardson vorgeschlagene Grading, modifiziert nach Elston und Ellis [21]. Die zu beurteilenden Kriterien sind dabei Mitoserate, Kernpleomorphie und Tubulusausbildung (Tabelle 3). Im Laufe der Jahre konnte eine Abhängigkeit von niedrigem histologischen Grading zu rezidivfreiem Überleben festgestellt werden [59].

Merkmale	Kriterien	Scorewerte	
Tubulusausbildung	> 75%	1	
	10-75%	2	
	<10%	3	
Kernpleomorphie	gering	1	
	mittelgradig	2	
	stark	3	
Mitoserate	0- 5 / 10 HPF	1	
	6-11/ 10 HPF	2	
	ab 12/10 HPF	3	
Summenscore:		3 – 9	
HPF= high power field (= 400fache Vergrößerung im Mikroskop).			
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	gering	G1	gut differenziert
6, 7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8, 9	hoch	G3	schlecht differenziert

Tabelle 3: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom nach Elston und Ellis [21]

2.1.3.3 Histologische Wachstumsmuster

Die Brust ist vorwiegend von Drüsen-, Fett- und umgebendem Bindegewebe aufgebaut. Das Drüsengewebe besteht wiederum aus den Drüsenläppchen (lobulärer Anteil) und den Drüsengängen (duktaler Anteil) [50].

Die histologische Klassifikation bezieht sich ausschließlich auf den histologischen Phänotypus des Tumors, der vom Pathologen unter dem Mikroskop bestimmt wird. Sind unterschiedliche Tumorkomponenten ausgeprägt, so werden diese zwar erwähnt, der dominierende Anteil wird aber diagnostisch in den Vordergrund gestellt. Von einem „reinen“ Karzinom-Typ ist laut EU-Leitlinien nur dann die Rede, wenn mindestens 90% des Tumors das jeweils charakteristische Muster aufweisen. Ein gemischter Typ liegt demnach dann vor, wenn der Anteil der zweiten Komponente mehr als 10% beträgt [19].

Das Wachstumsmuster eines Karzinoms wird als prognostischer Faktor gewertet. Verschiedene histologische Typen wie der muzinöse, papilläre oder tubuläre Typus stehen für eine gute Prognose der Patientin mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von ungefähr 95%. Diese haben allerdings nur eine sehr geringe Inzidenz von ca. 2-15% an der Gesamtheit aller Mammakarzinome [25, 48].

2.1.3.4 Hormonrezeptoren

Die Abwesenheit von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ist zumeist mit einer schlechteren Differenzierung des Tumors einhergehend. In diesem Zusammenhang werden häufiger frühe Rezidive und ein schlechteres Gesamtüberleben verzeichnet [94]. Da der Steroidhormonrezeptorstatus vor allem auch ein wichtiger therapierelevanter Faktor ist, wird auf genauere Details im Kapitel „Prädiktive Faktoren“ eingegangen.

2.1.4 Prädiktive Faktoren

Die Faktoren, die das Ansprechen einer Therapie und deren Erfolg vorhersagen, werden prädiktive Faktoren genannt. Es sind bis heute nur drei solcher Faktoren bekannt, die evidenz-basiert sind und zur Erstellung eines Therapiekonzeptes eingesetzt werden sollten: Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor), Menopausenstatus und HER-2/neu-Status [59]. Da der Hormonrezeptor- und HER-2/neu-Status in dieser Arbeit untersucht werden, wird im Folgenden genauer auf diese beiden prädiktiven Faktoren eingegangen.

2.1.4.1 Hormonrezeptoren

Wie bereits erwähnt, können die biologischen Verhaltensmuster verschiedener Mammakarzinome sehr variieren. Bei 60 – 80 % der Brusttumoren kann ein positiver Nachweis von Östrogenrezeptoren erbracht werden. Dagegen können Progesteronrezeptoren nur in ca. 40% der Mammakarzinome gefunden werden [53, 66]. Grundsätzlich gilt, dass die Expression beider Hormonrezeptoren ein Kennzeichen einer höheren Tumordifferenzierung ist. Dies bedeutet, dass das Rezeptor- und Aktivierungssystem noch intakt ist [66]. Besonders die Östrogenrezeptoren werden als primärer Ansatzpunkt für antihormonelle, speziell antiöstrogen wirksame Medikamente genutzt. Bei der Rezeptorbestimmung ist allerdings ein rein positives oder rein negatives Ergebnis nicht ausreichend. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen, deren Mammakarzinome ein hohes Level an Östrogenrezeptoren zeigten, wesentlich besser von einer antiöstrogenen Therapie profitierten als Patientinnen mit niedrig positiven Ergebnissen [31, 39, 80]. Jedoch werden alle Tumoren mit einer Positivität von mindestens 1% der Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor als potentiell endokrin sensitiv betrachtet [93].

Bei einem Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor positiven Tumor besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass eine endokrine Therapie, z.B. mit Tamoxifen (Selektiver Östrogen Rezeptor Modulator SERM), gut anschlägt. Ist nur der Östrogenrezeptor positiv, besteht eine Remissionsrate von 50%. Im Gegensatz dazu liegt die Remissionsrate weitaus niedriger (15%) wenn beide Rezeptoren negativ sind [49]. Allerdings sprechen Mammakarzinome mit negativem

Rezeptorstatus auf eine Chemotherapie deutlich besser an als hormonrezeptor-positive Tumoren [30].

2.1.4.2 HER-2

Das HER-2/neu-Gen ist das am häufigsten amplifizierte Onkogen des menschlichen Brustkrebses. Es wird zu einem Onkogen, wenn es überexprimiert wird, wenn also eine Zelle zu viel des entsprechenden Rezeptorproteins produziert [34]. Das humane HER-2/neu-Gen, auch c-erbB-2 oder *neu* genannt, kodiert ein 185-kDa Protein, das häufig als HER-2/neu-Protein, HER-2-Rezeptor oder p185^{HER-2} bezeichnet wird. Als eine Membranrezeptor-Tyrosinkinase zeigt das HER-2/neu-Protein Rezeptorhomologie mit dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR oder HER1) [15, 70]. Als normale Komponente des menschlichen Organismus wird das HER-2/neu-Gen von einer Vielzahl von Epithelzellen exprimiert und ist ein wichtiger Mediator für das Zellwachstum, die Differenzierung und die metabolischen Abläufe der Zelle [70]. Es liegt in allen normalen diploiden Zellen in zwei Kopien vor. Das HER-2/neu-Gen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert [88] und bei ca. 20 – 25 % aller Mammakarzinome amplifiziert [82, 84]. Die Überexpression dieses HER-2/neu-Rezeptors ist die direkte Folge der Amplifikation (Abbildung 1 [86]) und Bestandteil des Prozesses der malignen Transformation und der Tumorprogression [84, 90].

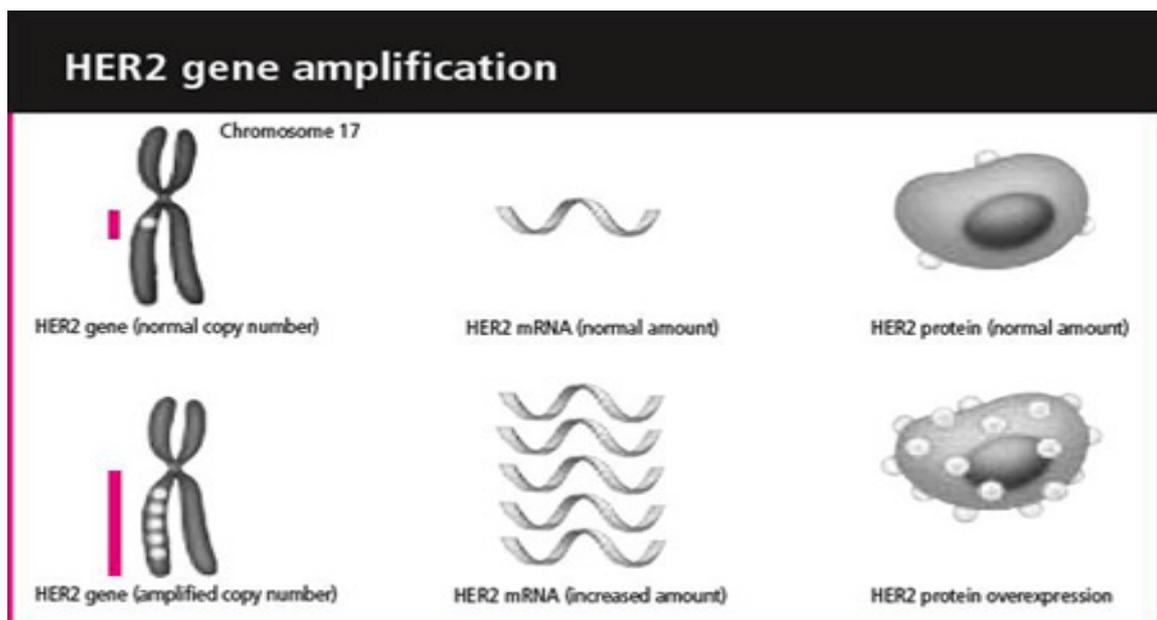


Abbildung 1: Die HER-2 Gen-Amplifikation resultiert in einer kontinuierlichen Überexpression des HER-2 Proteins auf der Zelloberfläche [86]

Dem HER-2/neu-Gen kommt eine immer größere Bedeutung für die Behandlung von Brustkrebspatientinnen zu, da es prädiktiv für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin TM) ist. Dieser ist gegen das HER-2/neu-Onkoprotein gerichtet und sowohl in der metastasierten, als auch seit 2006 in der adjuvanten Situation zugelassen [59].

Auf der anderen Seite geht sowohl die HER-2/neu-Überexpression als auch dessen Amplifikation mit einer erhöhten Aggressivität [82, 95] und verkürzten krebsfreien und allgemeinen Überlebenszeit [69] einher, und scheint prädiktive Bedeutung für die Sensitivität auf die konventionelle systemische Therapie zu haben. Es wurden HER-2/neu-Rezeptor amplifizierte und überexprimierte Mammakarzinome beobachtet, die weniger sensitiv, manchmal auch resistent gegenüber einer endokrinen Behandlung (z.B. Tamoxifen) reagierten [8]. Die in diesen Geweben oft niedrigen absoluten Werte von Östrogenrezeptoren könnten eine mögliche Erklärung hierfür sein [54]. Obwohl die Wirksamkeit der konventionellen CMF-Therapie (Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil) gegeben ist, so wird über eine bessere Wirksamkeit einer Anthrazyklin- und Taxanhaltigen Therapie bei diesen Patientinnen berichtet [73].

2.1.4.3 Topoisomerase-II- α

Die Topoisomerase-II- α ist weder ein prädiktiver noch ein prognostisch gesicherter Faktor. Da unsere Untersuchungen auch diesen biologischen Marker miteinbeziehen, wird er hier kurz erläutert:

Nicht nur die veränderte Regulation des HER-2/neu-Rezeptors, sondern auch die der Topoisomerase-II- α konnte in verschiedenen Neoplasien, und vor allem auch im humanen Mammakarzinomgewebe, gezeigt werden. Topoisomerase-II- α ist ein Schlüssel-Enzym in der DNA-Replikation und spielt somit eine wichtige Rolle während des Zellzyklus. Es katalysiert die Entspiralisierung der DNA bei der Replikation, indem es Doppelstrangbrüche einfügt. Dadurch kann sich die DNA entwickeln. Bevor die Replikation fortgesetzt wird, fügt die Topoisomerase-II- α die Stränge wieder zusammen [10, 100].

Das Topoisomerase-II- α Gen ist auf Chromosom 17q12-q21 lokalisiert, in unmittelbarer Nachbarschaft zum HER-2/neu-Onkogen (siehe Abbildung 2). Es ist zu ca. 30% in HER-2/neu amplifizierten Fällen koamplifiziert [45, 72, 92]. Verschiedene Studien konnten die Sensitivität maligner, Topoisomerase-II- α amplifizierter Zellen gegenüber Anthrazyklin-basierenden Therapieformen bestätigen [

14, 44, 72].

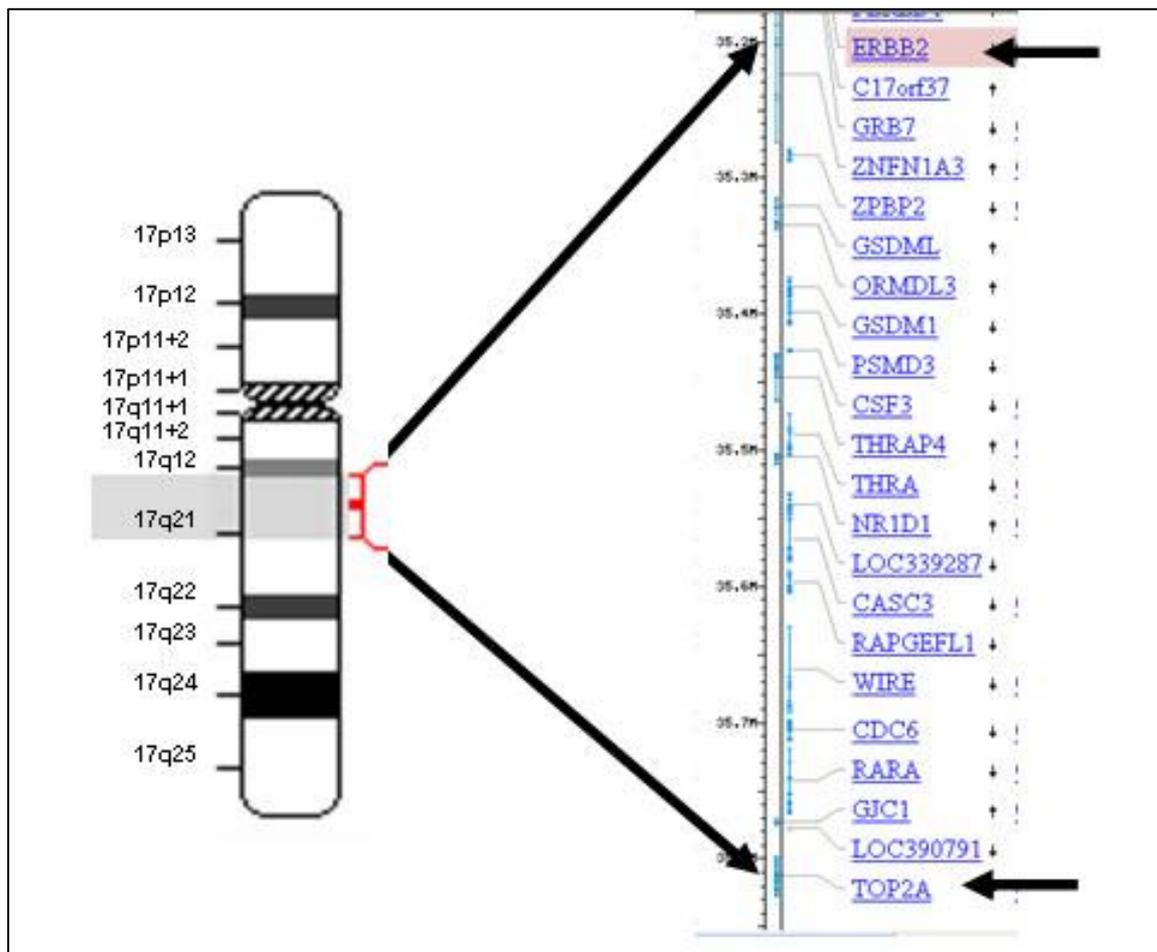


Abbildung 2: Nachbarschaft von HER-2 und Topoisomerase-II- α auf Chromosom 17 [83]

2.2 Therapie des Mammakarzinoms

Hohe Bedeutung hat die Arbeit des Pathologen gerade im Hinblick auf die Therapiemodalitäten zur Behandlung eines Mammakarzinoms. Er begutachtet jene Parameter, die für eine individuell geschneiderte Therapie ausschlaggebend sind. Einfluss auf die lokale sowie systemische Behandlung des Mammakarzinoms haben wie bereits erwähnt der histologische Tumortyp, standardisiertes histologisches Grading und die pTNM-Klassifikation. Im Hinblick auf das operative Vorgehen und die Bestrahlung haben zusätzlich das Vorliegen einer peritumoralen Gefäßinvasion, das Vorhandensein multipler Tumorherde sowie der Sicherheitsabstand zwischen Tumor und Schnitttrand eine große Bedeutung [59]. Für die systemische Therapie ist vor allem der Lymphknotenstatus, sowie Hormonrezeptor- und HER-2/neu-Status entscheidend [59]. Auch dem Amplifikationsgrad des Topoisomerase-II- α -Gens wird immer mehr Bedeutung zugemessen [

14].

Das Verständnis über die Tumorbilogie des Mammakarzinoms hat sich in den letzten Jahren stark gewandelt: „Vom ursprünglichen Verständnis einer lokalen Tumorerkrankung, die vornehmlich mit lokalen Maßnahmen zu beherrschen ist, hin zum aktuellen Bild einer häufig chronischen-systemischen Tumorerkrankung mit lokaler Komponente und früher systemischer Disseminierung, deren Schicksal vor allem durch systemische Therapiemaßnahmen beeinflusst werden kann“ [48]. Daher wird heutzutage in den meisten Fällen ein kombiniertes Therapiekonzept aus Operation, systemischer Therapie und Radiotherapie angewandt. Aufbau, Abfolge und Ausführung der verschiedenen Therapieblöcke ist von den jeweiligen Tumoreigenschaften und den individuellen Indikationsstellungen verschiedener Patientinnen abhängig.

2.2.1 Primär systemische Therapie

Alle medikamentösen Therapieformen, die nach der histologischen Diagnosestellung eines Mammakarzinoms und vor Durchführung jeglicher operativer Maßnahmen angewandt werden, werden als primär systemische Therapie (PST) bezeichnet [48]. Diese auch als neoadjuvante oder Induktionstherapie bezeichnete präoperative medikamentöse Behandlung wurde früher nur aus operationstechnischen Gründen durchgeführt, wie zum Beispiel bei einem ungünstigen Tumor-Brust-Verhältnis, beim inflammatorischen Karzinom oder bei inoperablen Patientinnen. Die Überlebensrate von Patientinnen mit neoadjuvanter systemischer Therapie und Patientinnen mit adjuvanter Therapie waren vergleichbar. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren die primär systemische Therapie immer häufiger bei primär operablen Mammakarzinom-Patientinnen angewendet. So konnte die Rate brusterhaltender Operationen erhöht werden. Die systemische Therapie kann durch zytostatische Medikamente erfolgen, oder aus einer antihormonellen Therapie bei positivem Hormonrezeptor-Status bestehen. [48]

2.2.2 Operative Therapie

Grundsätzlich ist die brusterhaltende Operation anzustreben, um der Patientin die psychische Krankheitsbewältigung zu vereinfachen. Dabei sollte der Tumor im Gesunden entfernt werden, mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1 mm für die invasive, 5-10 mm für die intraductale Komponente. Mithilfe der Schnellschnittuntersuchung kann gegebenenfalls sofort nachreseziert werden. Ist es nicht möglich, den Tumor im Gesunden zu entfernen, so muss ggf. eine modifizierte radikale Mastektomie folgen. Diese ist außerdem indiziert, wenn ein ungünstiges Tumor-Brust-Volumenverhältnis vorliegt, das Mammakarzinom vom inflammatorischen Typ ist, bei Multizentrität, bei ausgedehnter intraduktaler Komponente und wenn Kontraindikationen für eine postoperative Radiotherapie vorliegen [5, 48, 55].

Die Abklärung der axillären Lymphknotensituation (derzeit wichtigster prädiktiver Faktor) ist auf jeden Fall Bestandteil der operativen Therapie. Heutzutage wird die

Methode der Sentinellymphknoten-Dissektion - wenn immer möglich - anstelle der routinemäßigen Ausräumung der Lymphknotenlevel I und II durchgeführt. Da die Sentinellymphknoten, die sogenannten Wächter-Lymphknoten, die ersten Drainageabflussstationen darstellen, werden diese histologisch untersucht. Sind diese negativ, wird mit 90 – 95% Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass alle nachfolgenden Lymphknoten ebenfalls negativ sind. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist allerdings eine Tumorgröße kleiner als 3 cm, ein klinisch nodalnegativer Befund, eindeutig identifizierbare Wächterlymphknoten durch Patentblau oder Technetium, keine Voroperationen an der Brust und keine Multizentrität. Zusätzlich müssen die Wächterlymphknoten eindeutig identifizierbar sein. Dies erfolgt derzeit primär über ^{99m}Tc-markiertes Radiokolloid und bzw. oder lymphgängiger Farblösung wie z.B. Lymphazurin [4]. Obwohl Langzeitergebnisse von großangelegten Studien zur Sicherheit und Verlässlichkeit von Sentinel-Lymphknoten-Operationen ausstehen, ist dieses Vorgehen unter Beachtung der Einschlusskriterien zum Standardverfahren geworden. Das Ziel ist nicht zuletzt die mit einer axillären Lymphonodektomie verbundene Morbidität (z.B. Lymphödem) zu verringern. Ist der Sentinellymphknoten positiv, oder sind die Voraussetzungen für dieses Vorgehen nicht erfüllt, muss eine Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten aus den axillären Lymphknotenlevel I und II, also alle Lymphknoten lateral und kaudal des M. pectoralis major sowie zwischen lateralem und medialem Rand des M. pectoralis minor, durchgeführt werden [5, 48, 55].

2.2.3 Adjuvante Therapie

Das Mammakarzinom wird als eine primär systemische Erkrankung mit lokaler Komponente betrachtet. Selbst kleinste Karzinome können Mikrometastasen entwickeln, die noch vor einer Operation und anschließender Bestrahlung gestreut werden. Die lokalen Therapiemaßnahmen können diesen Vorgang nicht mehr rückgängig machen. Aus diesem Grund müssen systemische Therapien in Form von Medikamenten in die Behandlung mit eingebunden werden. Deren Ziel ist es, bei einer Patientin, die klinisch und nach bildgebenden Untersuchungen tumorfrei ist, das Risiko eines Rezidivs der Erkrankung zu verringern [59].

Bei der Indikationsstellung zur adjuvanten Therapie sollten dabei folgende Kriterien berücksichtigt werden:

- Individuelles Risiko für Lokalrezidiv und Fernmetastasierung
- zu erwartende Effektivität entsprechend den Ergebnissen großer prospektiver Studien und der Metaanalysen der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group [18]
- individuelles Risiko für therapieassoziierte Nebenwirkungen
- Präferenz der Patientin nach ausführlicher Aufklärung des zu erwartenden Nutzens und Gewinns bezüglich der Lebensverlängerung

Ziel ist es, für jede einzelne Patientin die richtige Therapie zu finden, um eine Über- oder Unterbehandlung zu vermeiden. In einem ausführlichen Arzt-Patienten-Gespräch sollte die Wahl der adjuvanten Therapie, deren Prognose, Effektivität und mögliche Nebenwirkungen erörtert werden [51].

2.2.3.1 Adjuvante Endokrine Therapie

Beim hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom zählt die endokrine Therapie bis auf eine Mindergruppe mit sehr günstiger Prognose (Tumorgröße < 1cm, G1, Her2/neu negativ, postmenopausal) als eine wichtige und nebenwirkungsarme Säule. Wie zuvor erwähnt betrifft dies ca. 70 % aller Betroffenen [50].

Der medikamentösen Therapie stehen Tamoxifen (Prä- und Postmenopause), GnRH-Analoga (Prämenopause) und Aromatasehemmer (Postmenopause) zur Verfügung [48, 50]. Tamoxifen ist ein sogenannter selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM) und wird bei prämenopausalen Patientinnen zusammen mit Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten (GnRH-Analoga) in einer Kombinationstherapie oder auch als Monotherapie eingesetzt. Aromatasehemmer der 3. Generation (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) wirken der Bildung von Steroidhormonen durch eine periphere Hemmung der Aromataseaktivität entgegen und sind zu einem festen Bestandteil der adjuvanten Therapie bei postmenopausalen Patientinnen mit rezeptorpositivem Mammakarzinom geworden [5, 50]. Die Aromatase katalysiert als Schlüsselenzym die Umwandlung von Androgenen zu Östrogen. Außerdem erwies sich diese

relativ nebenwirkungsarme Therapie mit Hormonantagonisten einer nebenwirkungsreichen Chemotherapie zumindest gleichwertig oder sogar überlegen [26].

2.2.3.2 Adjuvante Chemotherapie

Für die adjuvante Chemotherapie kommen Medikamente aus unterschiedlichen Substanzklassen und deswegen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zum Einsatz. Allerdings kann nicht jede Form von Brustkrebs mit einer Chemotherapie behandelt werden. Voraussetzung zur Applikation einer Chemotherapie ist die Belastbarkeit des Körpers. Liegen schwerwiegende internistische Grunderkrankungen (z.B. Leberfunktionsstörung, kardiale Dysfunktion) vor, kann ggf. eine erfolgsversprechende Therapie nicht verordnet werden. Beachtenswert vor, während und nach einer Chemotherapie bleiben auch Nebenwirkungen, die therapieassoziiert entstanden sind (z.B. Neuropathie, Hörstörung, kardiale Dysfunktion). Besonders junge Frauen müssen über die vorübergehende, teils auch permanente Ovarialinsuffizienz aufgeklärt werden [59].

Um bessere Remissionsraten und Überlebensraten zu erreichen, werden üblicherweise verschiedene Zytostatika miteinander kombiniert und gelten dann als sogenannte Polychemotherapie. Anthrazykline und Taxane sind wichtige Substanzen, die einen hohen Stellenwert in der adjuvanten Behandlung eingenommen haben. Sie gehören zu den wirksamsten Substanzen in der Therapie des Brustkrebses [72]. Resistenzentwicklungen können allerdings das jeweilige Zytostatikum in seiner Effektivität begrenzen [40].

2.2.3.3 Adjuvante monoklonale Antikörpertherapie

Seit einigen Jahren ist Trastuzumab (Herceptin®) in der klinischen Anwendung. Trastuzumab ist ein humanisierter Antikörper, dessen Wirkung sehr stark abhängig vom HER-2/neu-Rezeptor-Status des Tumors ist [12, 85, 98]. Exprimiert eine Zelle übermäßig viele HER-2/neu-Rezeptoren, so werden dieser Zelle laufend Proliferationssignale übermittelt. Der Antikörper geht mit dem Rezeptor einen Rezeptor-Ligand-Komplex ein. Dadurch wird die Signalkaskade

unterbrochen und eine zytostatische Wirkung wird vermittelt. Darüber hinaus werden diese Zellen vom körpereigenen Immunsystem erkannt und angegriffen [90]. Vier großangelegte Studien konnten zeigen, dass durch die Hinzunahme von Trastuzumab in die adjuvante Therapie in bis zu ca. 50% Rückfälle vermieden werden können [77, 83, 87]. Wegen dieser überaus motivierenden Erfolge wurde Trastuzumab in der adjuvanten Therapie für Patientinnen mit HER-2/neu positiven Mammakarzinomen zugelassen [81].

2.2.3.4 Adjuvante Radiotherapie

Der Stellenwert der Radiotherapie ist darin erkennbar, dass lediglich durch die Hinzunahme der Radiotherapie ein brusterhaltendes operatives Vorgehen vertretbar wurde. Nach den Daten der Early Breast Cancer Trialists' Group kann bei brusterhaltendem, operativem Vorgehen mit zusätzlicher Bestrahlung eine zur Mastektomie vergleichbare Sicherheit bezüglich eines Lokalrezidivs gewährleistet werden. Nicht zuletzt konnte gezeigt werden, dass sogar eine Verbesserung des Gesamtüberlebens mit der Radiotherapie erzielt werden konnte. [18]

Die Entscheidung, ob die Lymphabflusswege und die Thoraxwand bestrahlt werden sollten, ist abhängig von der Lymphgefäßinvasion und dem Status der Lymphknoten, und wird deswegen individuell getroffen [5]. Innovative Therapiekonzepte der Teilbrustbestrahlung kommen derzeit in internationalen Studien zur Anwendung. Ziel ist es, eine Übertherapie durch die perkutane Ganzbrustbestrahlung zu vermeiden [67].

2.3 Färbemethoden und Detektionssysteme in der Pathologie

2.3.1 Immunhistochemie

Das Reagenz der Immunhistochemie ist der Antikörper. Dieser bindet an zell-spezifische Proteine. Durch verschiedene Visualisierungsmethoden können die Antikörper-Bindungsstellen quantitativ unter dem Mikroskop beurteilt werden. Je nachdem welche Antikörper eingesetzt werden, können verschiedene biologische Marker sichtbar gemacht und mittels der Immunhistochemie charakterisiert werden.

2.3.1.1 Markierte Antikörper-Methoden

Direkte Methode

Die einfachste Färbemethode in der Immunhistochemie ist die direkte Methode, bei der ein enzymmarkierter Primär-Antikörper mit dem Gewebe-Antigen reagiert. Diese Methode ist zwar äußerst rasch durchgeführt und zeigt nur begrenzt unspezifische Reaktionen, aber der Nachteil ist eine sehr geringe Signalverstärkung [7].

Zwei-Schritt indirekte Methode

Bei dieser Methode bindet ein enzymmarkierter Sekundär-Antikörper an den unkonjugierten Primär-Antikörper. Da eine Vielzahl von Primär-Antikörpern aus einer Spezies mit dem gleichen Sekundär-Antikörper kombiniert werden kann, ist diese Methode flexibler. Eine gute Signalverstärkung wird dadurch bewirkt, dass meistens mehrere Sekundär-Antikörper mit verschiedenen Epitopen der Primär-Antikörper reagieren [7].

Drei-Schritt indirekte Methode

Noch mehr Signalverstärkung wird durch die drei-Schritt indirekte Methode erreicht, bei der sowohl der Sekundär- als auch der Tertiär-Antikörper mit dem gleichen Enzym versehen sind. Dabei ist der Tertiär-Antikörper gegen den Sekundär-Antikörper, und dieser gegen einen unkonjugierten Primär-Antikörper gerichtet [7].

2.3.1.2 Lösliche Enzym-Immunkomplex-Methoden

APAAP / PAP-Methode

Diese Methode beruht auf einem löslichen Enzym-Immunkomplex, der aus der alkalischen Phosphatase und einem gegen die alkalische Phosphatase gerichteten Antikörper, der Anti-alkalischen Phosphatase, besteht (APAAP). Alternativ kann er auch aus der Peroxidase und der Anti-Peroxidase (PAP) bestehen. Der lösliche Enzym-Immunkomplex haftet sich an den unkonjugierten Sekundär-Antikörper, welcher wiederum gegen den unkonjugierten Primär-Antikörper gerichtet ist. Durch Zugabe eines Visualisierungsreagenzes und dessen enzymatische Umsetzung entsteht eine sichtbare Färbung [

89].

(Strept)-Avidin-Biotin-Methode

Auch bei dieser Methode ist der Primär-Antikörper unkonjugiert, dafür ist jedoch der Sekundär-Antikörper biotinyliert, d.h. mit Biotin markiert. Besteht der Enzymkomplex aus Avidin (oder Streptavidin) und Biotin, wird diese Methode ABC (bzw. SABC)-Methode genannt. Spielt das enzymmarkierte Streptavidin in einem Enzym-Konjugat die Hauptrolle, spricht man von der LSAB-Methode [42].

2.3.1.3 Polymerkonjugat-Methoden

Das Polymerkonjugat ist mit Enzymen und Antikörpern markiert, und besteht aus einem Dextranmolekül (Polysaccharid-Rückgrat). Dadurch kann eine sehr gute Signalverstärkung erreicht werden. Beispiele hierfür sind EPOS und EnVision. Bei der Enhanced Polymer One Step Methode (EPOS) wird der Primär-Antikörper an das enzymmarkierte Dextranpolymer geknüpft. Im Gegensatz dazu ist EnVision eine Methode, bei der der Sekundär-Antikörper mit dem Trägermolekül verbunden wird.

Der Nachteil der Immunhistochemischen Bestimmung liegt darin, dass technische Artefakte gehäuft auftreten, und dass durch die Gewebepreparation und die

Anwendung verschiedener Antikörper unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden [71].

2.3.2 Nukleinsäureassays

2.3.2.1 Southern und Northern Blot

Der älteste Nukleinsäure-Assay, Southern Blot, wurde nach seinem Erfinder Edwin Southern benannt. Eine später entwickelte Variante des „Blotten“ wurde durch Wortspielerei als Northern Blot bezeichnet. Während beim Southern Blot die DNA die Grundlage bildet, wird beim Northern Blot RNA verwendet. Bei beiden Verfahren werden die Nukleinsäuren an künstlichen Oberflächen fixiert, bleiben dort aber trotzdem für die Hybridisierung verfügbar. Mittels Elektrophorese werden sie getrennt und durch einen „Abklatsch“ auf eine Membran aus Nitrozellulose oder Nylon übertragen. Dieser Schritt wird als „Blotting Prozess“ bezeichnet. In einer Lösung, die eine zur DNA bzw. RNA komplementäre Sequenz als Sonde enthält, erfolgt die Inkubation. Die Hybridisierung ist dann erfolgreich, wenn diese Sonde an die gesuchte Sequenz auf der Nitrozellulose bindet [58].

2.3.2.2 In situ Hybridisierung

Wie schon die Bezeichnung erahnen lässt, werden die Nukleinsäuren bei dieser Methode in der Zelle fixiert. Statt sie zuerst extrahieren zu müssen, werden sie somit am Ort ihres natürlichen Vorkommens gehalten. Die Morphologie des Gewebes wird dadurch bewahrt [65]. Ansonsten handelt es sich, wie bei den bereits beschriebenen Oberflächentests, um die präzise Anlagerung einer einsträngigen DNA-Sonde an komplementäre Zielsequenzen. Der große Vorteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass die hybridisierende Sonde in der Zelle bzw. im Gewebe lokalisiert werden kann. Das Problem der eingeschränkten Zugänglichkeit der Nukleinsäuren in die Gewebeschnitte wird entweder durch proteolytische Vorbehandlung oder Hitzevorbehandlung gelöst (Target Retrieval). Das Ergebnis der Hybridisierung der Sonde mit der entsprechenden zellulären DNA-Sequenz kann direkt unter einem Mikroskop betrachtet werden. Somit

können spezifische Nukleinsäure-Sequenzen in zytologischen Ausstrichpräparaten oder histologischen Schnittpräparaten sichtbar gemacht werden.

Es stehen unter anderem die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und die Chromogene in situ Hybridisierung (CISH) zur Verfügung. Sie unterscheiden sich in dem Reagenz, welches unter dem Mikroskop betrachtet werden kann [7, 58].

2.3.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung FISH

Um die Hybridisierungsergebnisse sichtbar zu machen, wird bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung ein fluoreszierender Farbstoff verwendet, der nur im Dunkelmikroskop betrachtet werden kann. Mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farben wird sowohl der gesuchte Genlocus als auch der Zentromerbereich des Chromosoms angefärbt. Anhand der Zahlenverhältnisse von Zentromerbereich und Genlocus kann der Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen, wie Translokation, Deletion oder Amplifikation, erbracht werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff schnell verblasst, müssen die Präparate zur Dokumentation aufwändig mit einer Digitalen Kamera fotografiert werden [29, 91].

2.3.2.4 Chromogene in situ Hybridisierung CISH

Im Gegensatz dazu wird für die Chromogene in situ Hybridisierung ein im herkömmlichen Lichtmikroskop sichtbarer brauner Farbstoff verwendet. Ein weiterer Vorteil bei CISH ist die Möglichkeit, simultan zur Auswertung die Histopathologie zu verifizieren, was bei der FISH-Untersuchung aufgrund der Dunkelheit nicht möglich ist. Jede normale, nicht amplifizierte Zelle enthält zwei braune Punkte. Alle Zellen, die viele Punkte oder richtige Cluster enthalten, gelten als amplifiziert [28, 91].

2.3.2.5 Sonden und Markierungsmethoden

Für die Hybridisierung stehen generell verschiedene Sonden zur Auswahl:

DNA = Desoxyribonukleinsäure: Sie ist in verschiedenen Größen einsetzbar, ist am besten charakterisiert und durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) hochverfügbar.

RNA = Ribonukleinsäure: Da die RNA einzelsträngig ist, muss diese nicht denaturiert werden.

PNA = Peptidnukleinsäure: Anstelle des Zucker - Phosphat - Gerüsts besteht die PNA aus einem Rückgrat von Amidverbindungen. Der Vorgang des Hybridisierens läuft deutlich schneller ab. Die PNA ist sehr effektiv bei der Diskriminierung von Basen-Paarungsfehlern.

Für den Markierungsvorgang mit dem Visualisierungsreagenz gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Der Marker kann entweder direkt bei der Polymerisation der Sonde eingebaut werden, oder aber im Anschluss daran durch eine entsprechende Kinase angefügt werden. Ebenso können Linker eingesetzt werden, die den Marker an die Sonde binden. Es besteht auch die Möglichkeit, den Marker synthetisch an das 5' bzw. 3'-Ende anzuhängen. [7]

3 Patientinnen und Methodik

Grundlage dieser Arbeit sind die Daten von 121 Patientinnen mit in die lokoregionären Lymphknoten metastasiertem Mammakarzinom, deren Operation im Zeitraum Dezember 1999 bis April 2002 im Rotkreuzklinikum - Frauenklinik - München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Wolfgang Eiermann, erfolgte. Bei allen Patientinnen handelte es sich um die Erstdiagnose eines Mammakarzinoms. Die damalige Aufarbeitung und Beurteilung der Exzidate erfolgte in der pathologischen Gemeinschaftspraxis Dr. med. Bernhard Högel, Dr. Dr. med. Clemens Becker und Dr. med. Michaela Beer.

3.1 Datenerhebung

Die Datenerfassung erfolgte durch Einsicht der Patientenakten im Archiv der Gemeinschaftspraxis Pathologie Dr. med. B. Högel, Dr. Dr. med. C. Becker und Dr. med. M. Beer. Anhand der Patientenummern wurden die damals angefertigten Hämatoxylin-Eosin-(HE)-gefärbten Schnitte erneut beurteilt und repräsentative, formalin-fixierte, paraffin-eingebettete Tumorböcke der Primärtumoren und der Lymphknotenmetastasen für die vorliegenden Untersuchungen bereitgestellt.

3.2 Einschlusskriterien

Die Datenanalyse umfasst Patientinnen, die folgende Kriterien aufwiesen:

- 1.) histologisch gesichertes invasives Mammakarzinom der Frau
- 2.) Operation im Zeitraum Dezember 1999 bis April 2002
- 3.) genügend archivierte invasives Tumormaterial des Primärtumors
- 4.) genügend archivierte invasives Tumormaterial in den ipsilateralen axillären Lymphknoten. Mikrometastasen wurden ausgeschlossen.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden insgesamt 121 Patientinnen in die Auswertung aufgenommen. Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden Östrogen-

und Progesteronrezeptorstatus, HER-2/neu sowie Topoisomerase-II- α bestimmt. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Chromogene in situ Hybridisierung (CISH) für HER-2/neu und Topoisomerase-II- α durchgeführt.

3.3 Herstellung des Untersuchungsmaterials

Um möglichst identische Untersuchungsbedingungen und somit eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Primärtumor und Metastase zu schaffen, wurden aus den originalen Paraffin-Blöcken neue, sogenannte Hybridblöcke, hergestellt (Abbildung 3).



Abbildung 3: Hybridblöcke aus Primärtumor- und Lymphknotengewebe

Anhand der archivierten HE-Schnitte von Metastase und Primärtumor wurden die jeweils invasiven Karzinombereiche markiert, die entsprechenden Paraffinblöcke zugeordnet, und die markierten Stellen mit einer 6mm-Stanze herausgestanzt. Die gestanzten Präparate wurden auf einer Heizplatte von Paraffin befreit, wodurch eine bessere Verbindung zu dem neuen Paraffinblock erzielt werden konnte. Um eine höhere Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins der invasiven Komponenten zu erreichen, wurde jeder Hybridblock mit jeweils zwei Primärtumorstanzen (oben) und zwei Metastasen-Stanzen (unten) aus frischem Paraffin hergestellt. Auf der Vorderseite wurden die Blöcke mit Fallzahl 1-121 bezeichnet. Dadurch wurde gleichzeitig gewährleistet, dass durch versehentliches Drehen der Blöcke Primärtumor und Metastase nicht vertauscht werden konnten. Anschließend wurden die Paraffin-Blöcke tiefgefroren, um später daraus 3 μm dünne Schnitte anzufertigen. Der jeweils erste Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um

zu kontrollieren, ob der invasive Teil des Tumors tatsächlich in der Stanze enthalten ist.

Zusätzlich wurden von jedem Fall sofort sechs weitere Schnitte auf Histobond-Objektträger für die Immunhistochemie und FISH aufgezogen. Dieses Vorgehen erwies sich im Nachhinein als großer Vorteil, da in einigen Blöcken nur noch sehr dünnes Tumormaterial vorhanden war, und dieses bei mehrfachem Anschneiden der Blöcke vorzeitig verloren gegangen wäre. Die Entscheidung, zusätzlich zur Fluoreszenz in situ Hybridisierung auch die Chromogene in situ Hybridisierung mit in die Arbeit einzubeziehen, fiel erst später. Aus diesem Grund wurden die dafür benötigten Schnitte zu einem späteren Zeitpunkt separat angefertigt.

Die fertig auf die Objektträger aufgezogenen Schnitte enthielten oben stets die Stanzen des Primärtumors, und unten die der Lymphknotenmetastasen (Abbildung 4).

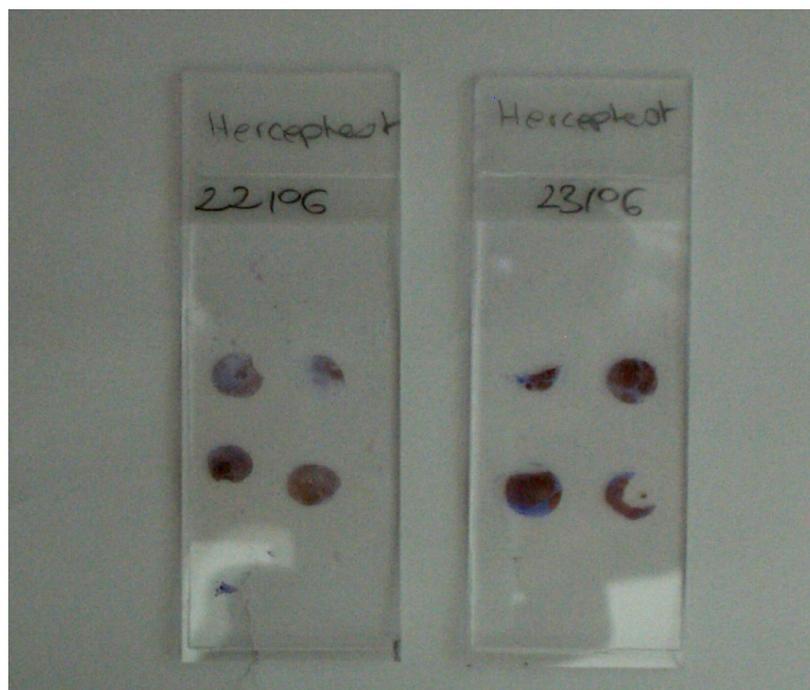


Abbildung 4: Objektträger mit je 2 Primärtumor- und Metastasenstanzen (Fall 22 und 23, hier bereits mit HercepTest gefärbt)

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Bestimmung von Estrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) und Topoisomerase-II- α

Der immunhistochemische Nachweis des Östrogen- und Progesteronrezeptors, sowie der Topoisomerase-II- α , erfolgte mit Klon 6F11 und Klon 16, sowie Klon SWT3D1, der Firma DCS, Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg. Der Mechanismus des Sichtbarwerdens beruht auf der Peroxidase/Anti-Peroxidase-Reaktion (PAP), wie unter „Färbemethoden“ bereits beschrieben.

Technische Durchführung:

Die Schnitte wurden über Nacht bei 50-60° Celsius im Brutschrank inkubiert, anschließend 20 Minuten in Xylol und der absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96% und 70% Alkohol entparaffiniert. Die Spülung der Präparate erfolgte in destilliertem Wasser. In der Peroxidase-Block-Lösung (H_2O_2 : Aqua dest. = 1 : 10) verweilten die Schnitte 10 Minuten. Dieser Schritt ist erforderlich, da die Diaminobenzidin-(DAB)-Methode auf der Peroxidase Reaktion basiert, und deswegen zur Vermeidung unspezifischer Färbungen vorher alle endogenen Peroxidasen blockiert werden müssen. Da die Epitope der Rezeptoren durch den Fixierungs- und Einbettprozess teilweise maskiert werden und diese somit vom Antikörper nicht mehr erkannt werden können, muss eine Antigen-Demaskierung durchgeführt werden. Diese erfolgte durch Kochen in Citratpuffer (Citratpuffer : Aqua dest. = 1 : 10; 6 Minuten) im Schnellkochtopf. Nach 20 Minuten, in denen die Schnitte im Citratpuffer abkühlten, wurden sie im System „Coverslip“ der Firma Shada mit Deck Küvette aufgestellt und mit Tris-Puffer 0,01M gespült. Das Auftropfen der Primärantikörper (Verdünnung: Topoisomerase-II- α : 1:50; ER: 1:60; PR: 1:100) erfolgte nach 10 Minuten, die Inkubation dieser benötigte abgedeckt 60 Minuten. Danach wurde wieder mit Tris-Puffer gespült und weitere 10 Minuten gewartet. Der im Anschluss daran aufgetropfte Sekundärantikörper von DCS musste weitere 15 Minuten einwirken. Nach erneuter Spülung der Schnitte mit Tris-Puffer wurde das Peroxidase-Label aufgetropft und 15 Minuten inkubiert. Bevor das DAB-Reagenz aufgebracht wurde, mussten die Schnitte wiederholt mit Tris-Puffer gespült werden.

Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit wurden die Positiv-Kontrollen unter dem Mikroskop überprüft, um den regelrechten Verlauf der Reaktion sicherstellen zu können. Während der gesamten Zeit wurde sehr genau darauf geachtet, dass die Schnitte unter keinen Umständen austrockneten. Im Anschluss wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und 5 Sekunden in Mayer's Hämatoxylin (Fa. Merck) gegengefärbt. Nach einer weiteren Sekunde in HCL-Alkohol (70%) wurden die Präparate erneut unter fließendem Leitungswasser gespült, durchwanderten die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Isopropylalkohol), Xylol, und wurden dann mit Eukit, einem xylolhaltigen Eindeckmedium, eingedeckt.

Auswertung ER und PR:

Die Auswertung des Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung der Färbeintensität und dem Prozentsatz positiver Zellkerne. Die Färbeintensität wurde mit 0 Punkten (keine Farbreaktion) bis 3 Punkte (starke Färbereaktion) angegeben. Der Prozentsatz positiver Zellkerne wurde mit 0 Punkten (keine positiven Kerne), 1 Punkt (weniger als 10% positive Kerne), 2 Punkte (10 – 50% positive Kerne), 3 Punkte (51 – 80% positive Kerne) und 4 Punkte (mehr als 80% positive Zellkerne) bewertet. Das Ergebnis wurde durch das Produkt dieser beiden Zahlenwerte (0-12) gebildet und als immunreaktiver Score (IRS) entsprechend Remmele und Stegner angeben [

75].

Um klinisch relevante Abweichungen der Hormonrezeptorwerte von Primärtumor und entsprechender Lymphknotenmetastase feststellen zu können, wurden für beide Steroidhormonrezeptoren die IRS-Werte 0 und 1 als negativ gewertet. Alle Werte ab 2 wurden positiv bewertet. Quantitative Abweichungen zwischen Primärtumor und Metastase wurden durch Bildung von Gruppen niedriger (1 bis 2 IRS-Punkte), mittlerer (3 bis 4 IRS-Punkte) und hoher Abweichung der Rezeptorpositivität (5 und mehr IRS- Punkte) erfasst.

Als diskordante Ergebnisse wurden nur Fälle gewertet, die entweder einen positiven Primärtumor bei negativer Metastase oder eine positive

Lymphknotenmetastase bei negativem Primärtumor aufwiesen. Weiterhin wurden Fälle mit einem Unterschied von 8 oder mehr IRS Punkten zwischen den Präparate-Paaren als diskordant angesehen.

Auswertung Topoisomerase-II- α :

Für die Auswertung der Topoisomerase-II- α wurde von allen Fällen jeweils ein Primärtumor und eine Metastase unter dem Mikroskop mit einer Vergrößerung um den Faktor 10 fotografiert. Gewählt wurden jeweils repräsentative Ausschnitte, anhand derer mindestens 200 Zellen abgezählt wurden. Nur die Zellen mit schwarzen und dunkelbraunen Zellkernen wurden positiv gewertet und im Verhältnis zu allen Zellen gezählt. Entsprechend den Vorgaben des Antikörper-Herstellers (DCS, Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg) wurde das Gewebe ab einem Wert von $\geq 20\%$ positiver Zellen als überexprimiert betrachtet.

3.4.2 Bestimmung des HER-2/neu-Rezeptors

Die Immunhistochemische Bestimmung des HER-2/neu-Rezeptors wurde mit dem HercepTest (DakoCytomation, California Inc.) durchgeführt. Dieser ist ein semiquantitativer immunhistochemischer Assay für die Bestimmung der Überexpression des HER-2 Proteins in Mammakarzinom-Geweben.

Technische Durchführung:

Die Inkubation über Nacht, die Rehydrierung und die Epitopdemaskierung erfolgte entsprechend dem Verfahren zur Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptors: Die Schnitte wurden bei 50-60° Celsius im Ofen für 30-60 Minuten erhitzt, um das Paraffin zu schmelzen. Daraufhin wurden die Objektträger in ein Xylenbad für ca. 5 Minuten eingelegt, durchliefen anschließend die absteigende Alkoholreihe und wurden in destilliertem Wasser rehydriert. Die Epitopdemaskierung erfolgte in einem Wasserbad bei 95-99°Celsius, wobei die im Kit enthaltene Epitope retrieval solution mit destilliertem Wasser im Verhältnis 10 : 1 angesetzt wurde. Die Schnitte wurden darin 40 Minuten lang inkubiert und kühlten anschließend 20 Minuten in der Epitopdemaskierungslösung ab. Die Spülung der Präparate wurde mit 1:10 verdünntem Waschpuffer durchgeführt. Im Anschluss erfolgte 5 Minuten lang die Inkubation mit Peroxidase-Blockierungsreagenz. Erneut wurde mit Waschpuffer gespült. Die Inkubation mit dem nun aufgetragenen primären Kaninchenantikörper gegen das humane HER-

2-Protein benötigte 30 Minuten. Es erfolgte eine weitere Spülung mit Waschpuffer. Das anschließend aufgetropfte Visualisierungsreagenz beruht auf der Dextran-Technologie und besteht sowohl aus sekundären Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulinmolekülen, als auch aus Meerrettichperoxidase-Molekülen. Diese sind mit einer gemeinsamen Dextranpolymer-Hauptkette verknüpft. Nach weiteren 30 Minuten wurde das Visualisierungsreagenz mit Waschpuffer abgespült. Schließlich wurden die Objektträger mit Substrat-Chromogen-Lösung betropft, dessen enzymatische Umsetzung in der Bildung eines sichtbaren Reaktionsproduktes am antigenen Ort resultierte. Nach weiteren 10 Minuten Einwirkzeit wurde erneut gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämatoxylin (Fa. Merck). Abschließend wurden die Präparate wie bei dem Verfahren für die Östrogen- und Progesteronbestimmung nach einer Sekunde im HCL-Alkohol (70%) mit fließendem Leitungswasser gespült, mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Eukit eingedeckt.

Bei jedem Färbedurchgang wurden die von DakoCytomation mitgelieferten Kontrollobjektträger zur Bestätigung der ordnungsgemäßen Funktion aller Reagenzien, sowie eigene Positivkontrollen zur Verifizierung der Effektivität des Fixierverfahrens und der Epitopdemaskierung mitgefärbt. Zusätzlich wurden entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers in jedem Durchlauf Negativkontrollen untersucht, um eine Kit-Kreuzreaktivität mit Zellen bzw. Zellbestandteilen auszuschließen und die Spezifität der Markierung des Target-Antigens durch den primären Antikörper zu belegen.

Auswertung:

Die Interpretation des HercepTests erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers durch Bewertung der Färbeintensität und des Färbemusters der Membran [38]. Als negativ wurden die Score-Werte 0 (keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als 10% der Zellen) und 1+ (sehr schwache, unvollständige Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen) definiert. Ein Score-Wert von 2+ wurde für eine schwach positive Überexpression vergeben, also bei mehr als 10% der Tumorzellen, wenn diese eine schwache bis mittelgradige, komplette Anfärbung der Zellmembran aufwiesen. Mit einem Score Wert von 3+ (stark positiv) wurden Präparate bewertet, die eine intensive Färbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen zeigten.

Zytoplasmatisch gefärbte Tumoranteile, sowie nicht maligne Epithel- und Stromazellen mit Rezeptorbesatz, wurden von der Bewertung ausgeschlossen, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

3.5 in situ Hybridisierung

Das Untersuchungsmaterial für die Fluoreszenz und Chromogene in situ Hybridisierung zum Nachweis einer HER-2/neu Amplifikation bestand aus allen Fällen, die im HercepTest eine Überexpression zeigten (2+ und 3+). Da bereits in früheren Studien eine Amplifikation der Topoisomerase-II- α in HER-2/neu nicht amplifizierten Fällen ausgeschlossen wurde [17, 45, 52, 72], wurden die in situ Hybridisierungen zum Nachweis einer Topoisomerase-II- α Amplifikation erst zu einem späteren Zeitpunkt und nur an HER-2/neu amplifizierten Fällen durchgeführt.

3.5.1 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die technische Durchführung erfolgte mit dem PathVision Kit von Vysis (Abbott Molecular Inc., Illinois), der für formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben humaner Mammakarzinom-Gewebe zum Nachweis einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens mittels FISH konzipiert ist. Der Locus Specific Identifier LSI, auch Locus-spezifische HER-2/neu DNA-Sonde genannt, ist eine spezifische DNA-Sonde für den Genlocus HER-2/neu (17q11.2-q12), die direkt mit SpectrumOrange, einem orange fluoreszierender Farbstoff, markiert ist. Sie hat eine Länge von 190 kD. In einer zweiten Versuchsreihe wurde das PathVision Kit für den Nachweis einer Topoisomerase-II- α -Amplifikation desselben Herstellers verwendet. Die spezifische DNA-Sonde für den Genlocus Topoisomerase-II- α ist ebenfalls direkt mit SpectrumOrange markiert. Mit SpectrumGreen ist die zentromerspezifische DNA-Sonde direkt markiert. Diese Fluoreszenz-DNA-Sonde hat eine Länge von 5,4 kD und ist für die alpha-Satellit-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) spezifisch. [29]

In diesem Kit sind die Sonden in Hybridisierungspuffer vorgemischt und vordenaturiert, was die Handhabung erheblich erleichtert. Zusätzlich enthalten die Sonden nicht-markierte Blockierungs-DNA. Diese dient dazu, die Sequenzen in

den Ziel-Loci zu unterdrücken, die auch in anderen Chromosomen enthalten sind. Der Test ermöglicht bereits den Nachweis von nur 2 bis 8 Kopien des Onkogens, erfordert nur wenig Tumormaterial und ist nicht radioaktiv [29].

Beide Versuchsreihen liefen nach denselben Regeln und unter gleichen Bedingungen ab.

Vorbehandlung:

Die Schnitte wurden 3 mal hintereinander jeweils 10 Minuten in Xylol geschwenkt. Nach 2 jeweils 5 minütigen Ethanolbädern (100%) wurden sie auf Filterpapier luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Präparate 20 Minuten in 0,2 normalem HCL gehalten, um sie danach jeweils 3 Minuten mit Aqua dest. und Waschpuffer zu spülen. Bei 80° Celsius wurden sie für 30 Minuten in der Pretreatment-Lösung erhitzt. Erneutes Spülen erfolgte mit destilliertem Wasser (1 Minute) und mit Waschpuffer (2 mal, jeweils 5 Minuten). Anschließend wurden die Schnitte bei 37°Celsius im Protease-Puffer für 12 Minuten erwärmt, um die DNA in ihre einsträngige Form zu denaturieren. Mit Waschpuffer wurde erneut 2 mal jeweils 5 Minuten gespült. Die Schnitte durchliefen daraufhin die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 100% Ethanol) und wurden in einem Hybridisierungsgerät (HY-Brite) bei 37° Celsius 3 Minuten getrocknet. In der Zwischenzeit wurde der bei -20° Celsius tiefgefrorene Locus Specified Identifier auf Raumtemperatur erwärmt und in einem dafür vorgesehenen Gerät (Vortexer) gemischt. Um den Inhalt auf den Gefäßboden zu bringen, wurde er kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugiert und anschließend noch einmal vorsichtig gemischt.

Hybridisierung:

Bereit zur Hybridisierung wurden je 10 µl der Sonde auf die Objektträger pipettiert und sofort mit einem Deckglas abgedeckt. Um ein mögliches „Luftziehen“ zu verhindern, wurden die Ränder mit einem Fotokleber abgedichtet. Im HY-Brite Programm Nr. 1 wurden die Schnitte zuerst bei 85°Celsius für 3 Minuten, dann bei 37°Celsius für 18 Stunden inkubiert. Da die Sonden mit SpectrumGreen bzw. mit SpectrumOrange fluorophor-markiert sind und deswegen unter Lichteinwirkung ausbleichen, wurde ab dem Zeitpunkt der Sondenvorbereitung mit minimaler Lichteinwirkung gearbeitet.

Posthybridisierungsphase:

In der Posthybridisierungsphase wurde zunächst der Fotokleber vorsichtig entfernt und die Deckgläser im Posthybridisierungs-Waschpuffer bei Raumtemperatur herunter genommen. Überschüssiger Puffer wurde abgetropft. Die Schnitte wurden für 2 Minuten in Posthybridisierungs-Waschpuffer bei 72° Celsius getaucht und anschließend in der Dunkelkammer luftgetrocknet.

Die Kontrastfärbung bestand aus DAPI, 4,6-Diamidino-2-phenylindol (je 10 µl). Dies ist ein blau-fluoreszierendes Reagenz aus Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Glycerin und Puffer. Als letzter Schritt wurden Deckgläser aufgelegt und mit Lack fixiert. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte dunkel und kühl aufbewahrt und innerhalb einer Woche ausgezählt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanleitung des PathVision Kits (Vysis) unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung [29]. Mindestens 20 Zellen aus repräsentativen Arealen wurden ausgezählt. Dazu wurden bei jedem Zellkern die Zahl der LSI HER-2/neu bzw. der LSI Topoisomerase-II- α (orange Signale) und die Anzahl der Zentromer-(CEP-17)-Signale (grüne Punkte) bestimmt. Ab einem Quotienten der ermittelten Zahlenwerte LSI : CEP > 2,0 galten die Zellen als amplifiziert. Weiterhin wurde nach Pauletti et al. (1996) zwischen schwach und hoch amplifiziert unterschieden. Dazu wurden die Gensignale nicht im Verhältnis gesehen, sondern in ihrer absoluten Anzahl erfasst. Schwache Amplifikation: Gensignale in mehr als 10% der Zellkerne $4 < x \leq 10$, Quotient LSI : CEP > 2,0 und hohe Amplifikation: Gensignale in mehr als 10% der Zellkerne > 10 , Quotient LSI : CEP > 2,0. [68]

3.5.2 Chromogene in situ Hybridisierung (CISH)

Zum Nachweis wurde das ZytoDotSPEC HER2 Probe Kit und für Topoisomerase-II- α das ZytoDotCISH Implementation Kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven) verwendet. Die Sonde aus diesem Kit besteht aus Digoxigenin-markierten Polynukleotiden, die spezifisch gegen die Sequenzen des HER-2/neu- bzw. Topoisomerase-II- α -Gens gerichtet sind. Die Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde wird über einen primären, nicht-markierten Antikörper nachgewiesen. Dieser primäre Antikörper wird von einem sekundären, mit Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper detektiert. Erst die Umsetzung von Diaminobenzidin (DAB) führt zur Entstehung permanenter, brauner Signale. Sie können im Lichtmikroskop mit einer 40-fachen Trockenlinse betrachtet werden [28].

Vorbehandlung:

Die Vorbereitung der Präparate für die Hybridisierung bestand aus Entparaffinieren und Proteolyse. Dazu wurden die Gewebe auf 4 μm geschnitten und auf einer Wärmeplatte für 10 Minuten bei 70°Celsius gewärmt. Zuerst wurden sie in Xylol (3 mal 15 Minuten) und 100% Ethanol (3 mal 2 Minuten) entparaffiniert und anschließend mit Aqua dest. 3 mal 2 Minuten gewaschen. Die Objektträger wurden daraufhin in die Pretreatment-Lösung überführt (94°Celsius, 10 Minuten) und 3 mal 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nach Hinzufügen des Pretreatment-Enzyms wurden die Präparate für weitere 10 Minuten bei 37°Celsius im HY-Brite inkubiert. Wieder wurden die Objektträger gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 95%, 2 mal 100%) für jeweils 2 Minuten dehydriert. Die Trocknung erfolgte für 20 Minuten an der Luft.

Denaturierung und Hybridisierung:

Jeweils 15 μl der Sonde wurden zentral auf das Gewebe pipettiert und mit einem Deckglas und Fotokleber verschlossen. Im HY-Brite wurden die Präparate bei 94°Celsius 3 Minuten lang denaturiert und anschließend bei 37°Celsius über Nacht hybridisiert.

Stringentes Waschen:

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Deckgläser am nächsten Tag vorsichtig entfernt, die Objektträger in 0,5 SSC Puffer im Wasserbad bei 75° Celsius für 5 Minuten gewaschen und anschließend 3 mal 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült.

Immunfärbung:

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate 10 Minuten in Wasserstoffperoxid (3%) getaucht, mit Aqua dest. gespült und die Blocking-Solution auf die Objektträger aufgetropft. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Blocking Solution vorsichtig abgeschüttelt. 2 Tropfen des Primärantikörpers wurden jeweils auf die Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Vor dem Auftropfen des Sekundärantikörpers wurden die Präparate mit PBS/Tween gewaschen (3 mal 2 Minuten). Auch der Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Bevor das DAB-Chromogen auf die Objektträger pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert wurde, erfolgte eine erneute Spülung der Präparate mit PBS/Tween (3 mal 2 Minuten). Mit destilliertem Wasser wurde die Reaktion gestoppt und mit Mayer's Hämatoxylin Solution erfolgte die Gegenfärbung. In der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 95%, 2 mal 100% Ethanol) und Xylol (2 mal 2 Minuten) wurden die Gewebe dehydriert und nach erfolgter Lufttrocknung blasenfrei eingedeckt.

Auswertung:

Das Hybridisierungssignal der Chromogenen in situ Hybridisierung erscheint als braunes punktförmiges Signal, welches sich deutlich vom Zellhintergrund (mit Hämatoxylin gegengefärbt) abhebt. Mit einer 20fachen Vergrößerung wurden, wie bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung, mindestens 60 Zellen eines repräsentativen Bereichs ausgezählt. Bei Vorkommen von mehr als zwei einzelnen braunen Punkten oder bei Auftreten von kleinen oder großen „Clustern“ wurde das Gewebe als amplifiziert betrachtet [28]. In Abbildung 5 ist die Amplifikation des HER-2/neu durch viele braune Punkte (links) und Cluster (rechts) zu erkennen.

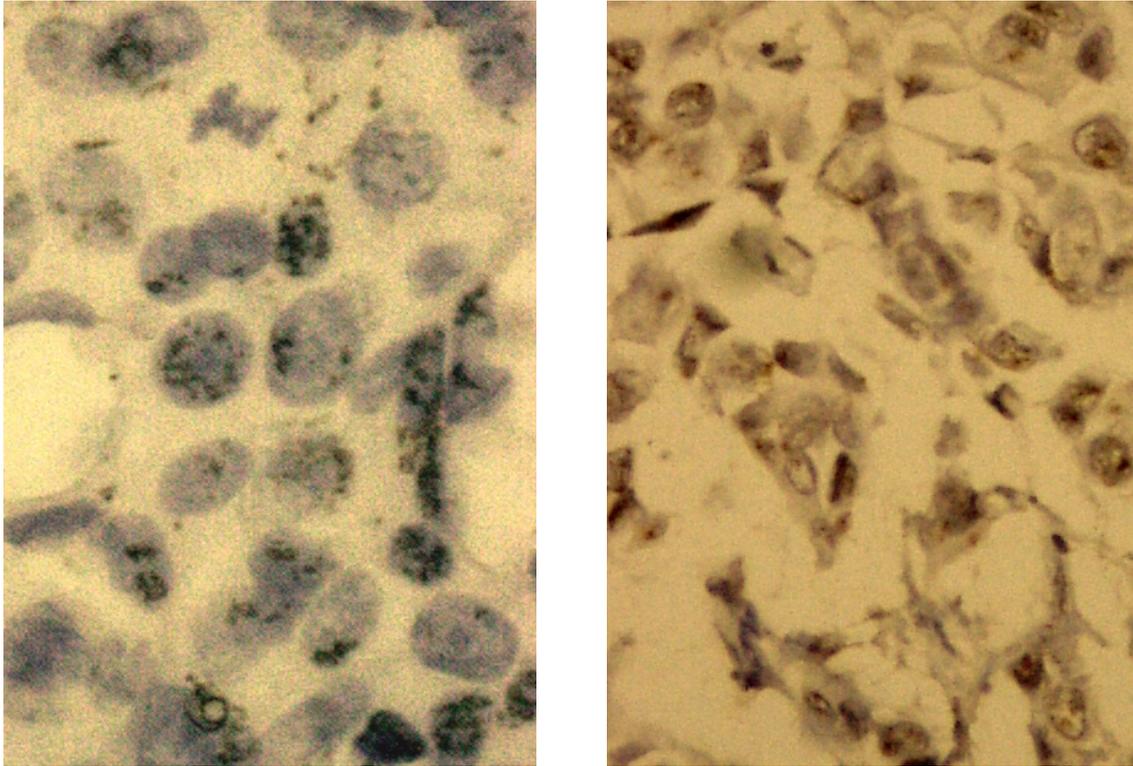


Abbildung 5: HER-2/neu Amplifikation erkennbar durch viele braune Punkte pro Zelle (links) und Cluster (rechts)

3.5.3 Mikroskopausrüstung:

Zur Auswertung der Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde ein Auflichtfluoreszenzmikroskop verwendet. Die Anregungslichtquelle bestand aus einer 100-Watt-Quecksilberdampf Lampe. Das Mikroskop verfügte über einen Multibandpassfiltersatz. Im Gegensatz dazu wurden sämtliche immunhistochemischen Färbungen, sowie die Chromogene in situ Hybridisierung unter einem Standard-Lichtmikroskop ausgewertet.

3.6 Statistische Methoden

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde festgestellt, ob die Abweichungen der Ergebnisse zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase zufällig aufgetreten oder wesentlicher Natur sind.

Man geht von der Hypothese aus, dass die Häufigkeiten der Nichtübereinstimmungen nur eine zufällige Stichprobenschwankung zeigen. Diese Hypothese wird als Nullhypothese (H_0) bezeichnet.

Der Wert Chi Quadrat (χ^2) und die daraus resultierende Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde für jede Versuchsreihe in Microsoft Excel berechnet. Dazu wurden für jeden Rezeptor die Anzahl der positiv gewerteten Primärtumore (erwartete Häufigkeit) und die Anzahl der davon positiven Metastasen (tatsächliche Häufigkeit), sowie die negativen Primärtumore (erwartete Häufigkeit) und die dazugehörigen negativen Lymphknotenmetastasen (tatsächliche Häufigkeit) (siehe Tabelle 4) in folgende Formel eingesetzt:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(A_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

wobei gilt:

A_{ij} = tatsächliche Häufigkeit in der i-ten Zeile, j-ten Spalte

E_{ij} = erwartete Häufigkeit in der i-ten Zeile, j-ten Spalte

r = Zeilenanzahl

c = Spaltenanzahl [78]

Anzahl positiver Primärtumoren	Anzahl negativer Primärtumoren
E_{ij}	E_{ij}
Davon positive Metastasen	Davon negative Metastasen
A_{ij}	A_{ij}

Tabelle 4: Tabelle zur Berechnung des χ^2

Der Chi Quadrat Test gibt die Wahrscheinlichkeit für eine Chi-Quadrat-Verteilung mit $df = (r - 1)(c - 1)$ Freiheitsgraden zurück, in diesem Fall also mit einem Freiheitsgrad.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ entspricht einem Chi Quadrat Wert von 3,841. Das bedeutet, dass nur dann die Nullhypothese mit 5%iger Irrtumswahrscheinlichkeit verworfen und von einem signifikanten Ergebnis gesprochen werden kann, wenn das berechnete χ^2 größer als der Tabellenwert $\chi^2_{1;0,05} = 3,841$ und dadurch $p \leq 0,05$ ist [78].

4 Ergebnisse

Folgende Daten und klinische Parameter der 121 Patientinnen wurden erhoben und ausgewertet:

- Tumorgrading
- Patientenalter bei Operation
- Histologischer Tumortyp
- Östrogenrezeptorstatus
- Progesteronrezeptorstatus
- HER2/neu-Status
- Topoisomerase-II- α -Status

Sämtliche neu hergestellte Schnittpräparate zur Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, HER-2/neu- und Topoisomerase-II- α -Status wurden in getrennten Durchläufen für Primärtumor und Metastase ausgewertet, um eine Beeinflussung des Betrachters zu vermeiden. Alle Fälle wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Untersuchern bewertet. Bei Diskordanz wurde der Fall erneut betrachtet und ein Konsens erreicht.

Tumorgrading, Patientenalter bei Operation, sowie der histologische Tumortypus wurden ausgewertet, um aufzuzeigen, dass diesbezüglich keine Selektion für diese Arbeit stattgefunden hat. Diese Parameter sind im vorliegenden Kollektiv absolut zufällig verteilt. Die einzige durchgeführte Selektion war die Auswahl von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom in die ipsilateralen Lymphknoten. Mikrometastasen wurden ausgeschlossen.

4.1 Tumorigradung

Die Häufigkeit der Differenzierungsgrade nach Bloom und Richardson verteilte sich wie folgt:

Im untersuchten Kollektiv von 121 Präparaten fanden sich 7 (5,83 %) gut differenzierte Karzinome (G1), gefolgt von den schlecht differenzierten (G3), die in 48 Fällen (40,0 %) gefunden wurden. Mit 65 (54%) Patienten war der Großteil der Mammakarzinome mäßig differenziert (G2).

4.2 Altersverteilung

Der Großteil der Patientinnen war zum Zeitpunkt der Primäroperation zwischen 41 und 60 Jahre alt (58%). Nur ein sehr geringer Anteil (3%) war zu diesem Zeitpunkt zwischen 30 und 40 Jahre. Mit zunehmendem Alter wurde der Anteil der Patientinnen immer geringer (Diagramm 1).

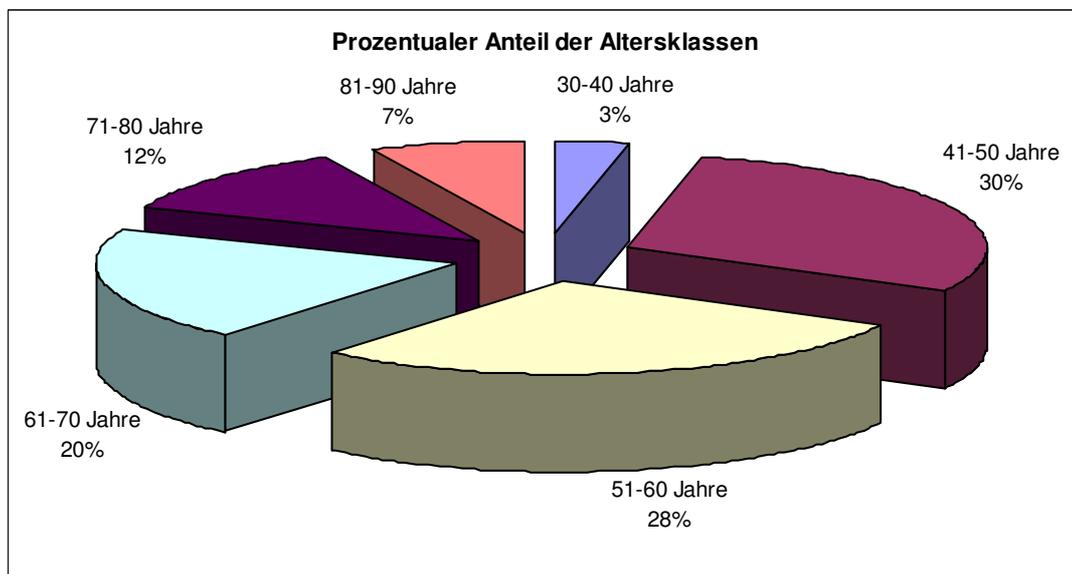


Diagramm 1: Prozentualer Anteil der Altersklassen

Unter dem Median wird der Wert verstanden, bei dem 50% einer zu untersuchenden Gesamtheit unter, und 50% über diesem Wert liegen. In dieser Studie liegt der Median bei 56 Jahren. Die Quartile beträgt im vorliegenden

Kollektiv 49 Jahre, d.h. 25% der Patientinnen waren bei Primäroperation jünger als 49 Jahre, und 75% waren älter.

4.3 Histologischer Tumortyp

Unter den Primärtumoren waren 83 (68,6%) ductale, 21 (17,4%) lobuläre, 7 (5,8%) medulläre, 4 (3,3%) tubulolobuläre Karzinome, sowie jeweils ein (0,8%) apokrines, mikropapilläres, metaplastisches, ducto-lobuläres und muzinöses Karzinom. Letztere wurden in Diagramm 2 unter „Rest“ zusammengefasst. Zu einem Tumorgewebe konnten keine Angabe gemacht werden.

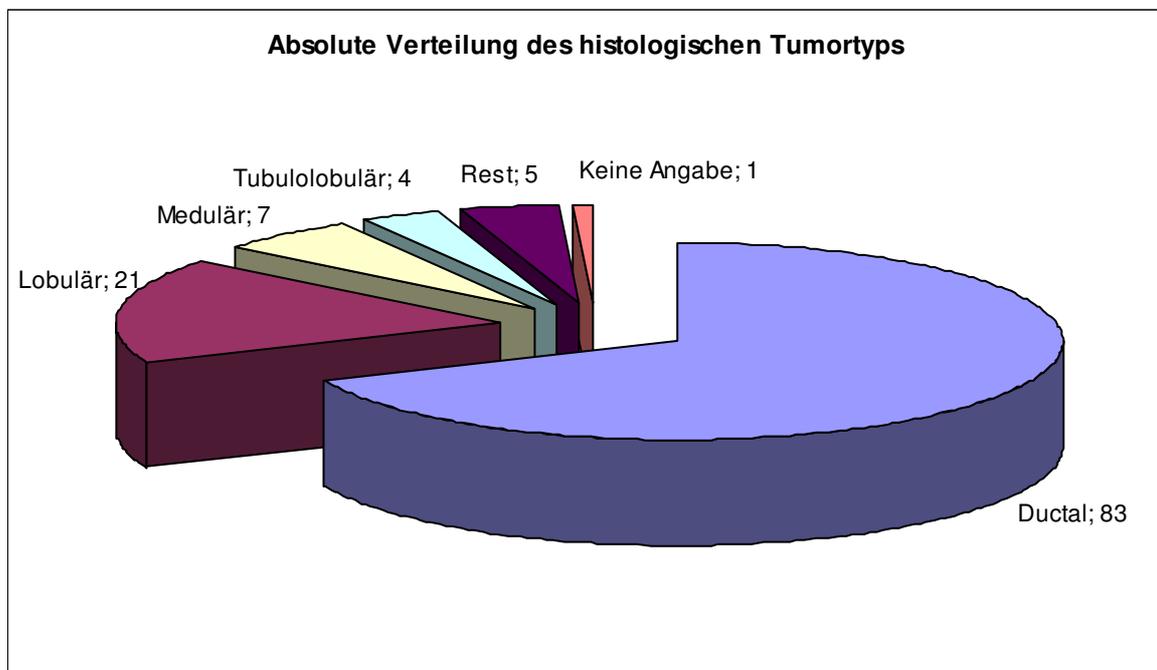


Diagramm 2: Absolute Verteilung des histologischen Tumortyps

4.4 HER-2/neu

4.4.1 HercepTest (Immunhistologie)

Von 121 Fällen konnten 117 bezüglich des HER-2/neu-Rezeptors ausgewertet werden. 4 Fälle mussten ausgeschlossen werden, da in dem Schnittpräparat kein Tumorgewebe mehr enthalten war.

Insgesamt wurden 90 Fälle (76,9%) negativ (0 oder 1+) gewertet. Von den 27 positiv gewerteten Fällen (23,1 %) waren 11 schwach positiv (2+) und 16 Fälle stark positiv (3+).

16 Primärtumore konnten mit 3+ bewertet werden. Bei 3 (18,8%) dieser Fälle wurde die korrelierende Metastase mit 2+ gewertet, die restlichen 13 (81,2%) Fälle zeigten dieselben Ergebnisse (3+) wie ihre Primärtumoren. Weiterhin wurden 11 Primärtumore mit 2+ benotet. 7 (63,7%) der dazugehörigen Metastasen wurden ebenfalls mit 2+, 3 (27,3%) wurden mit 3+, und 1 (9,1%) mit 1+ bewertet.

Von den restlichen 90 Fällen zeigten 14 (12,0%) den Wert 1+, davon wurden wiederum nur 9 (64,3%) korrespondierende Lymphknoten ebenfalls mit 1+ beurteilt. Die Wertung der Metastasen der restlichen 5 Primärtumoren ergab 3 mal 0 und jeweils 1 mal 2+ und 3+ (vergleiche Abbildung 6).

Der Rest der Primärkarzinome (n=76, 65,0 %) wurde mit 0 bewertet. 8 (10,5%) dazugehörige Metastasen zeigten 1+, 1 Fall (1,3%) zeigte ein schwach positives Ergebnis (2+). Alle übrigen Lymphknotenmetastasen waren ebenfalls 0.

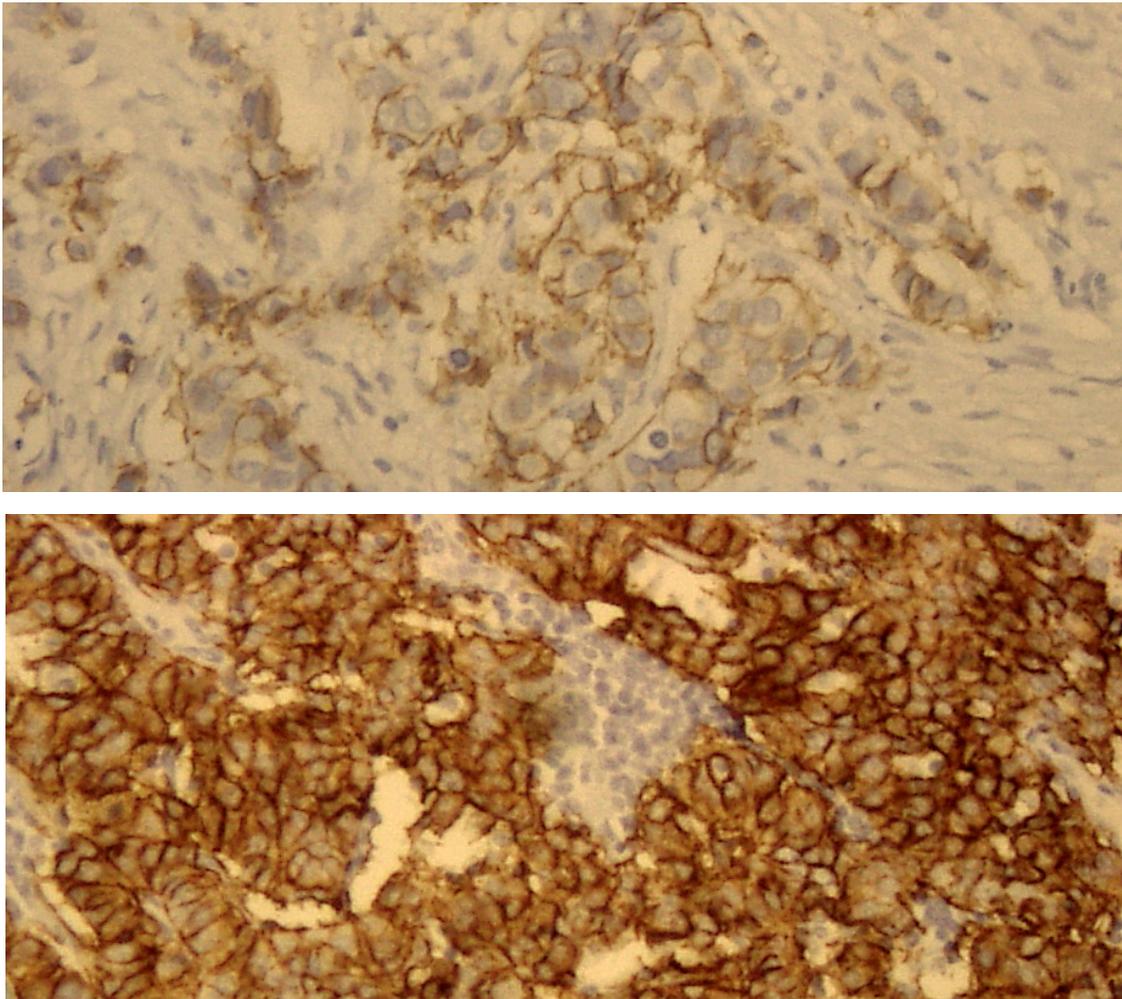


Abbildung 6: Diskordantes Ergebnis (Fall 80): Primärtumor HER-2/neu negativ (1+, oben), Lymphknotenmetastase positiv (3+, unten)

Setzt man eine Grenze, die nur zwischen positiv (2+, 3+) und negativ (0, 1+) unterscheidet, so kann von einem einzigen (0,8%) positiven Primärtumor berichtet werden, dessen Metastase negativ war, und 3 (2,6%; $p = 0,711$) negative Primärtumoren, deren korrespondierende Lymphknotenmetastasen ein positives Ergebnis zeigten. Somit ergibt sich eine Konkordanz von 96,6 %. Diagramm 3 zeigt die diskordanten Fälle in roter, die konkordanten Ergebnisse in grüner Farbe.

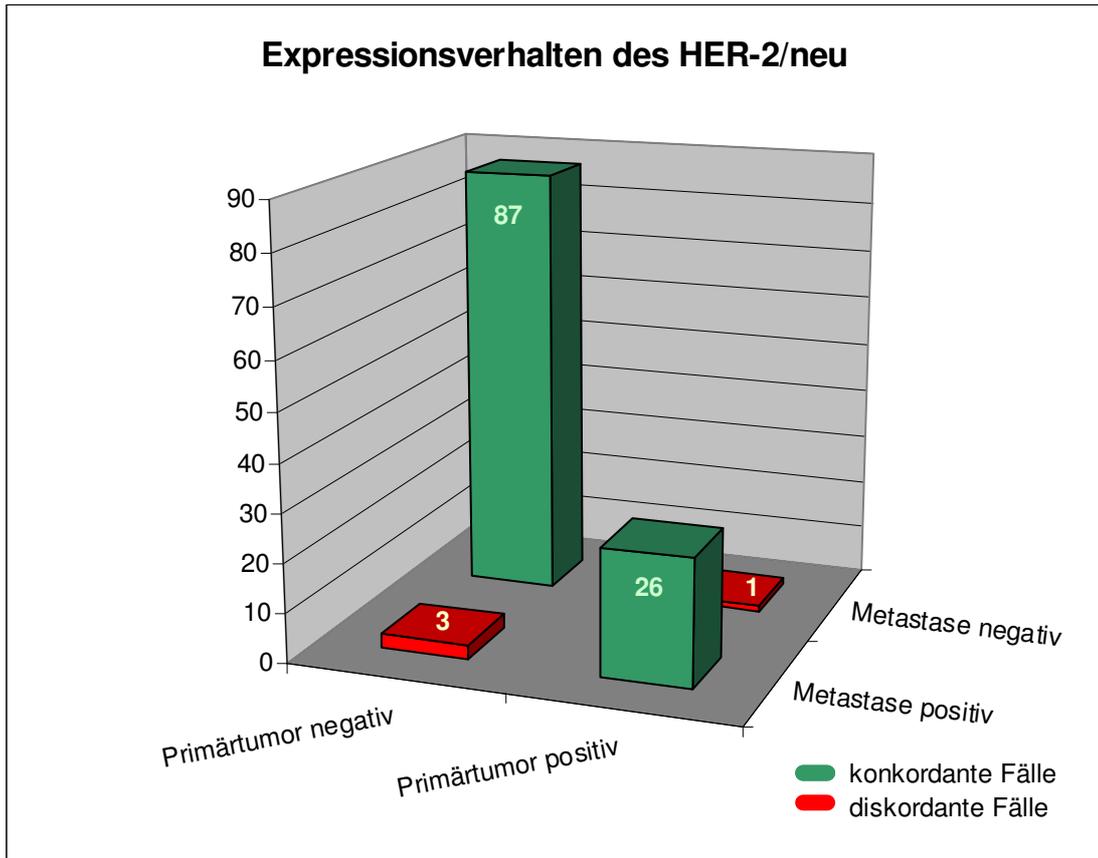


Diagramm 3: Expressionsverhalten des HER-2/neu in Primärtumor und Metastase

Eine weitere Aufschlüsselung in Tabelle 5 zeigt die genaue Verteilung der Bewertungen des HercepTests:

Primärtumor:	3+	2+	1+	0
Metastase:				
3+	13	3	1	-
2+	3	7	1	1
1+	-	1	9	8
0	-	-	3	67

Tabelle 5: Überexpression des HER-2/neu Rezeptors

4.4.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Alle 16 der mit 3+ bewerteten Primärtumore waren amplifiziert (93,7%), davon 14 (87,5%) hoch (siehe Abbildung 7) und 2 (12,5%) schwach amplifiziert.

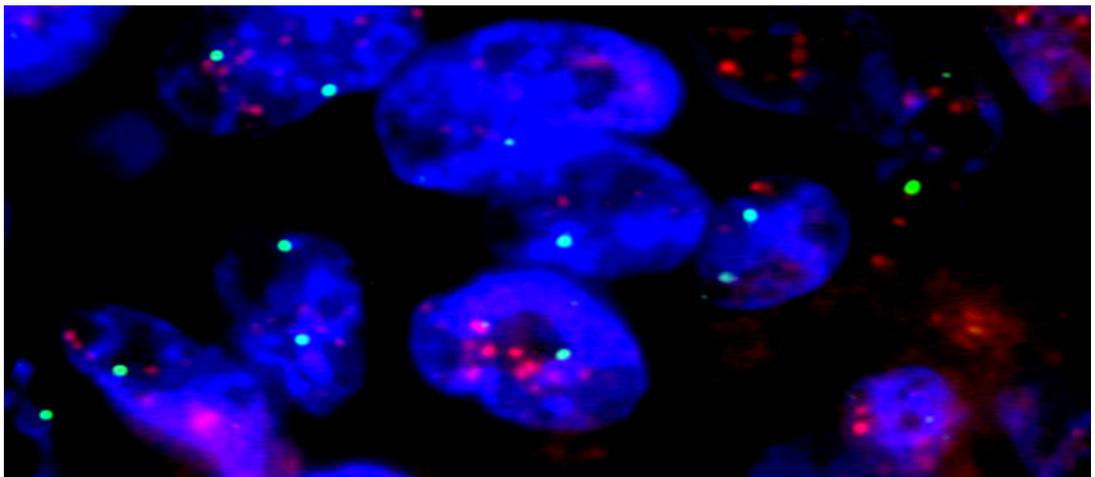
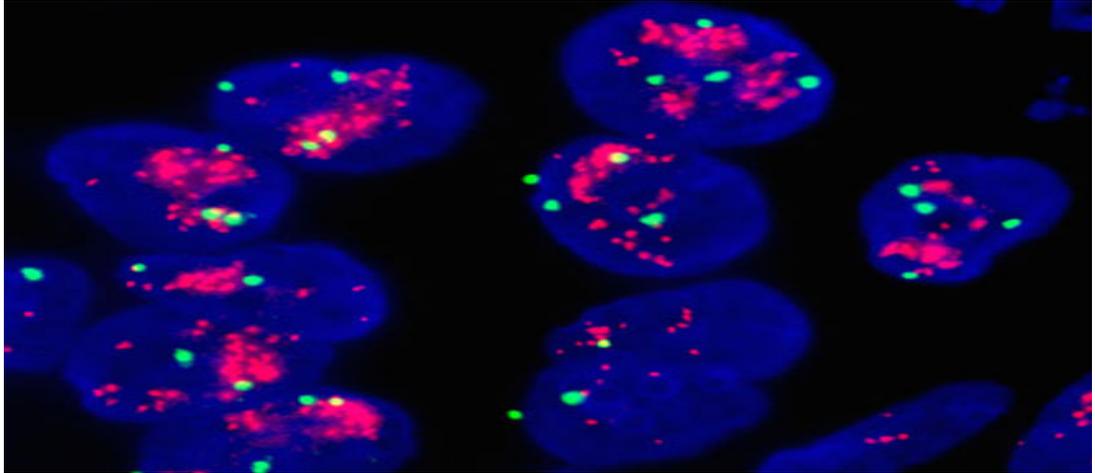


Abbildung 7: HER-2/neu hoch amplifizierter Primärtumor (oben) und Lymphknotenmetastase (unten), Fall 50

Von den 11 immunhistochemisch 2+ gewerteten Karzinomen zeigten 10 (90,9%) eine Amplifikation. Davon waren 6 (54,5%) hoch, 4 (36,4%) schwach und einer (9,1%) nicht amplifiziert. Unter den schwach amplifizierten Fällen gab es einen Fall, dessen Lymphknoten auch denselben Amplifikationsgrad aufwies, aber immunhistochemisch ein negatives Ergebnis zeigte (1+).

3 Fälle zeigten einen hoch bzw. schwach amplifizierten Primärtumor, der in der Immunhistochemie allerdings negativ ausfiel (1+ und 0). Die dazugehörigen Metastasen reagierten in der Immunhistochemie positiv (2+ bzw. 3+), weswegen die Präparate auch in die FISH-Untersuchung mit eingeschlossen wurden. Die Metastasen zeichneten sich mit demselben Amplifikationsgrad ihrer Primärtumoren aus.

Die unterschiedlichen Expressionsverhalten von Primärtumor (PT) und Lymphknotenmetastase (LK) sind in Diagramm 4 anschaulich dargestellt. Die Fälle, die als amplifiziert gekennzeichnet sind, sind wie bereits beschrieben, jeweils in Primärtumor und Metastase amplifiziert.

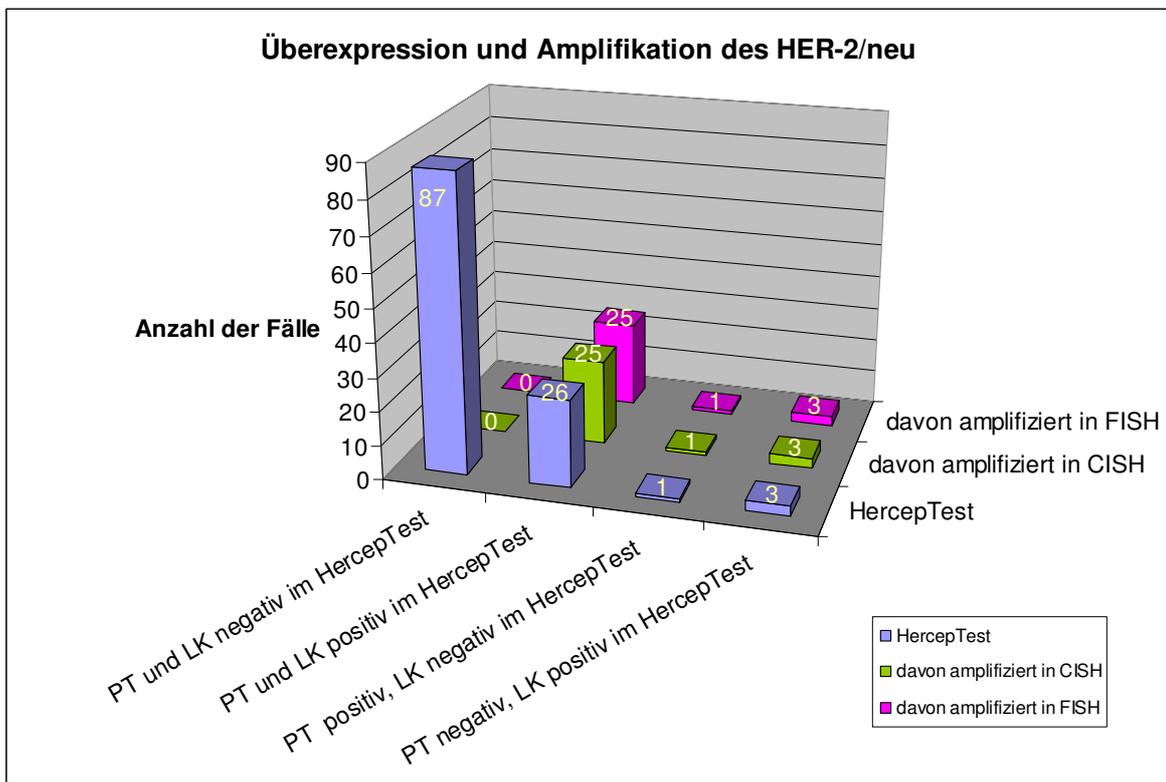


Diagramm 4: Überexpression und Amplifikation des HER-2/neu

4.4.3 Chromogene in situ Hybridisierung (CISH)

Dieselben 29 Fälle, die in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung amplifiziert waren, zeigten in der Chromogenen in situ Hybridisierung ebenfalls eine Amplifikation (siehe Diagramm 4). In allen Fällen waren Primärtumor und korrespondierende Metastase amplifiziert. Eine Unterscheidung zwischen starker und schwacher Amplifikation wurde nicht gemacht.

Insgesamt waren 29 der 30 (96,7%) HercepTest positiven Fälle in FISH und CISH amplifiziert. Bezogen auf das Gesamtkollektiv sind dies 24,8%.

Alle Fälle zeigten trotz teilweise differierender HercepTest Ergebnisse denselben Grad der Amplifikation in den entsprechenden Metastasen. Dieser kann also zwischen Primärtumor und Metastase mit einer Konkordanz von 100% angegeben werden. Außerdem waren die Ergebnisse von CISH absolut konkordant zu den Ergebnissen von FISH (100%).

4.5 Topoisomerase-II- α

4.5.1 Immunhistochemie

Es konnten insgesamt 116 Fälle ausgewertet werden. 5 Fälle wurden aufgrund mangelndes Tumorgewebes ausgeschlossen.

10 der 116 Fälle reagierten positiv, davon 6 Fälle, deren Primärtumor und Lymphknotenmetastase positiv waren. 2 der restlichen 4 Fälle zeigten nur im Primärtumor eine Positivität (Abbildung 8). Die anderen 2 waren nur in der Lymphknotenmetastase positiv, im Primärtumor negativ.

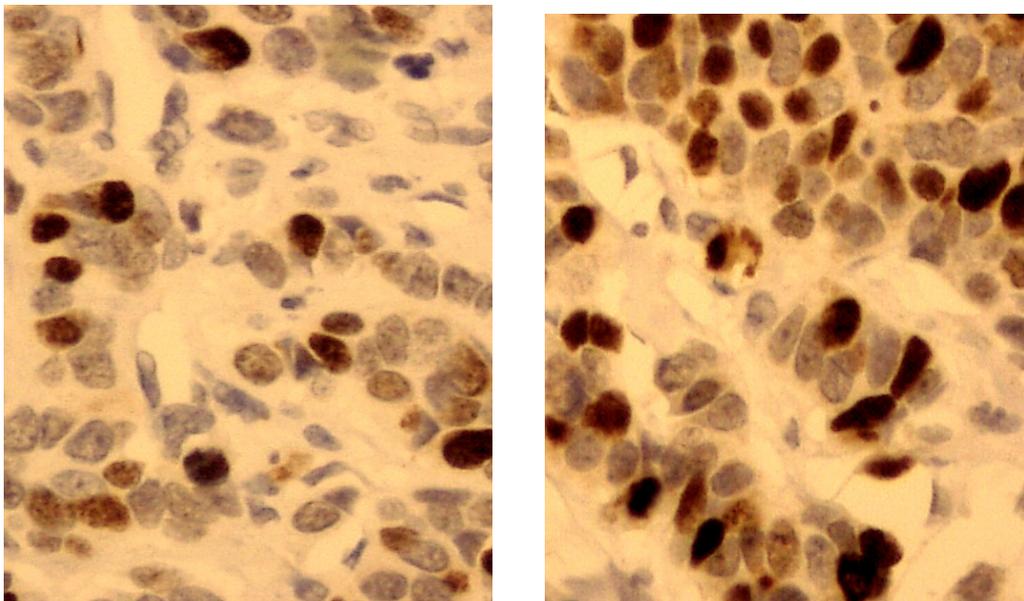


Abbildung 8: Überexpression (22,8%) der Topoisomerase-II- α im Primärtumor (links), negative Lymphknotenmetastase (15%) (Fall 84)

Die übrigen 106 (91,4%) Fälle waren in jeweils beiden Gewebepräparaten negativ. Möchte man das Konkordanzverhalten zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase ermitteln, so waren insgesamt 4 Fälle diskordant (3,4%; $p=0,464$), die übrigen 112 Fälle (96,6%) zeigten jeweils gleiches Expressionsverhalten in Primärtumor und Metastase (vergleiche Diagramm 5).

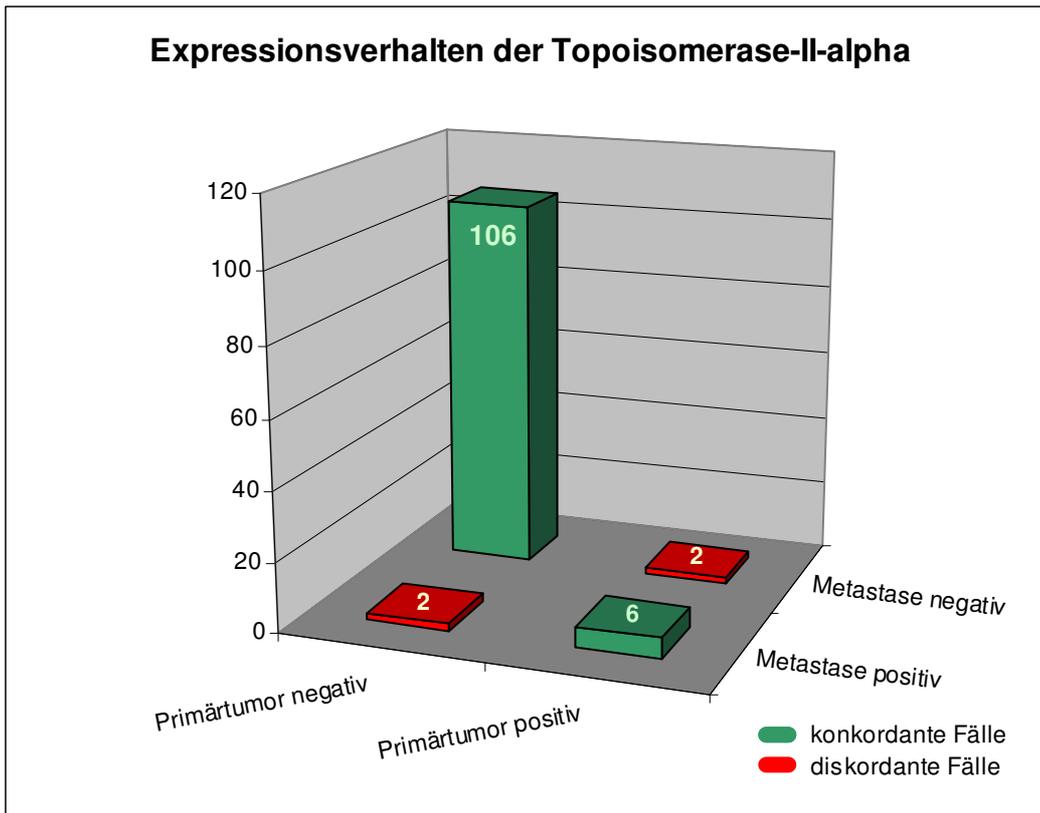


Diagramm 5: Expressionsverhalten der Topoisomerase-II- α zwischen Primärtumor und Metastase

4.5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Nur drei Fälle zeigten sowohl im Primärtumor als auch im Lymphknoten eine schwache Amplifikation (Abbildung 9). Alle drei Primärtumore waren immunhistochemisch überexprimiert, allerdings nur zwei der Metastasen.

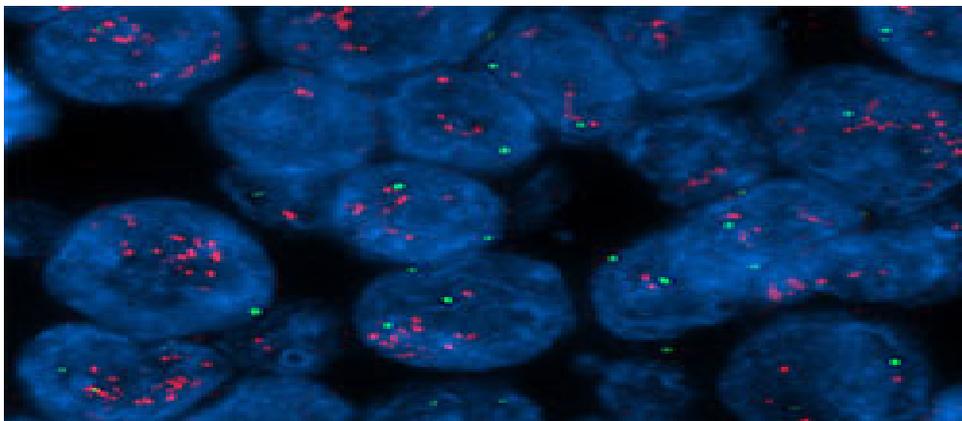


Abbildung 9: Amplifikation der Topoisomerase-II- α im Primärtumor von Fall 73

4.5.3 Chromogene in situ Hybridisierung (CISH)

Im Gegensatz zu FISH waren bei CISH insgesamt 13 Fälle (44,8%) amplifiziert, jeweils im Primärtumor und der Lymphknotenmetastase. 9 dieser Fälle wurden schon in der Immunhistochemie positiv bewertet. Die restlichen 4 Fälle reagierten in der Immunhistochemie negativ mit Werten von 15% +/- 2% positiv gefärbter Zellen.

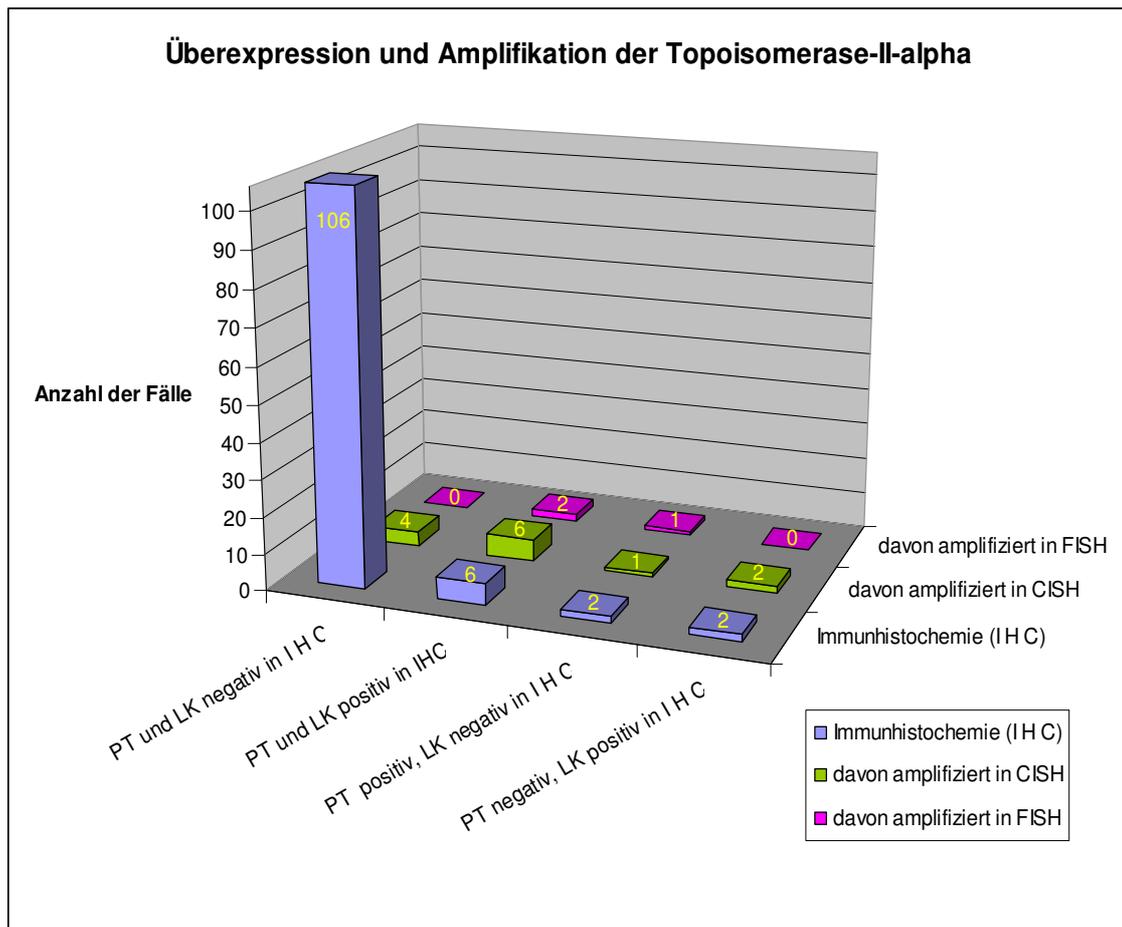


Diagramm 6: Überexpression und Amplifikation der Topoisomerase-II- α

Diagramm 6 stellt die Verteilung der amplifizierten Fälle in Bezug zu den immunhistochemischen Ergebnissen dar. Der Grad der Amplifikation zeigte sowohl bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung als auch bei der Chromogenen in situ Hybridisierung eine Konkordanz von 100% zwischen Primärtumor und zugehöriger Lymphknotenmetastase.

4.6 Östrogenrezeptor (ER)

Primärtumor und Metastase unterschieden sich in ihrem Expressionsverhalten des Östrogenrezeptors fast nicht. In 25 von 117 auswertbaren Fällen (21,4%) zeigte der Primärtumor zwar einen höheren Wert an ER als die Metastase, allerdings nur um 2 (9 Fälle = 7,7%), 4 (15 Fälle = 12,8%) und 6 (1 Fall = 0,8%) IRS-Punkte. Umgekehrt waren die Rezeptor-Werte der Lymphknoten im Vergleich zum Primärtumor in 21 (17,9%) Fällen um 2 (13 Fälle = 11,1%), 4 (7 Fälle = 6,0%) und 6 (1 Fall = 0,9%) IRS-Punkte erhöht. In diesen Fällen kann demnach nicht von einem diskordanten Verhalten gesprochen werden, da Primärtumor und Lymphknotenmetastase positiv reagierten. Die Quantität der Rezeptorexpression differierte nur leicht.

In 68 Fällen (58,1%) waren die Score-Werte der jeweiligen Präparate-Paare identisch. Von 117 Patientinnen konnte nur bei 3 (2,6%) eine Diskrepanz zwischen negativ und positiv festgestellt werden (Abbildung 10).

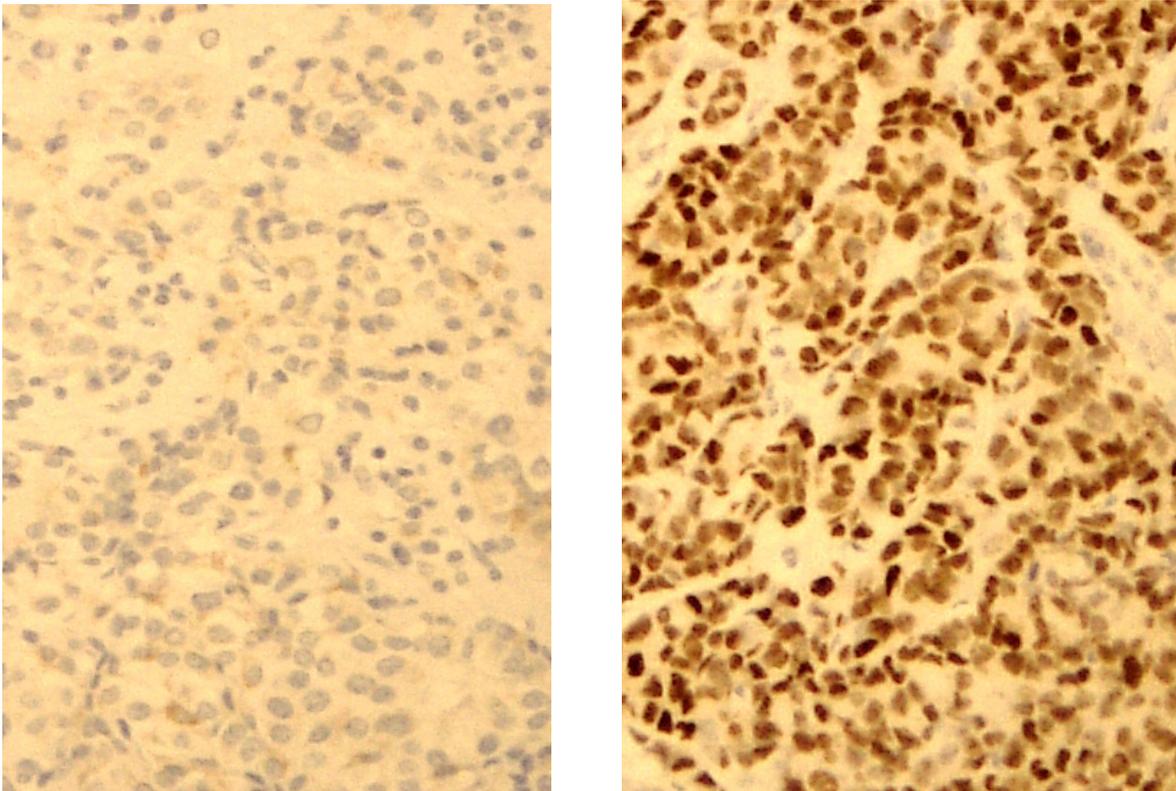


Abbildung 10: Fall 70: Östrogenrezeptor negativer Primärtumor (IRS=0; links) und positive Metastase (IRS=4; rechts)

Es liegt somit eine nicht signifikante Diskordanz von 2,6% ($p = 0,69$) des Expressionsverhaltens der Östrogenrezeptoren zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase vor.

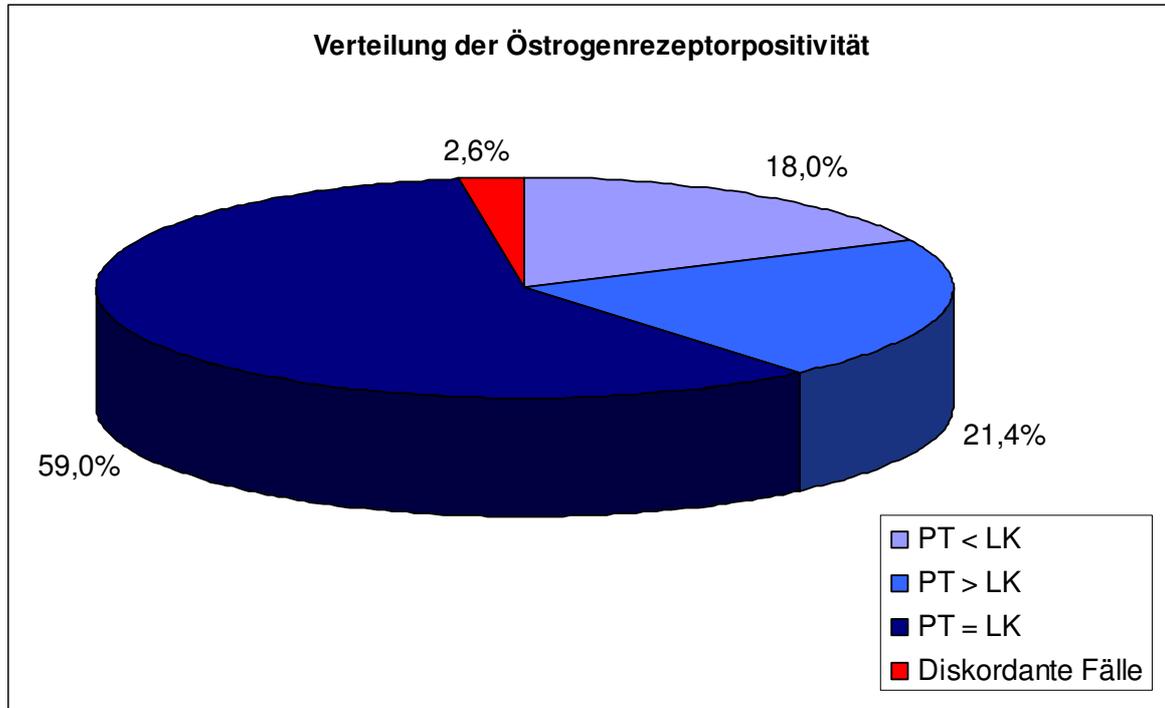


Diagramm 7: Konkordanz des Östrogenrezeptorwertes zwischen Primärtumor (PT) und Lymphknotenmetastase (LK)

Diagramm 7 zeigt die diskordanten Fälle in rot (2,6%). Die Summe der blauen Felder bezeichnet alle konkordanten Fälle, davon stellt der dunkelblaue Abschnitt diejenigen Fälle dar, die absolut identische Ergebnisse zwischen Primärtumor und Metastase zeigten (PT = LK). Mittelblau sind die Fälle mit höherem Primärtumor-Score (PT > LK), hellblau die mit höherem Lymphknoten-Score dargestellt (PT < LK).

4.7 Progesteronrezeptor (PR)

Auch die Auswertung des Progesteronrezeptors zeigte nur geringe Unterschiede des Rezeptorstatus zwischen primärem Mammakarzinom und den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.

116 Präparate standen für die Auswertung der Progesteronrezeptoren zur Verfügung. 22 (19,0%) Primärtumore zeigten einen um 2 (8 Fälle = 6,9%) bzw. 4 (14 Fälle = 12,1%) IRS-Punkte erhöhten Progesteronwert als ihre korrespondierenden Lymphknoten. Umgekehrt konnten Metastasen-Werte beobachtet werden, die im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren um 2 (3 Fälle = 2,6%), 4 (4 Fälle = 3,5%) und 6 (1 Fall = 0,9%) IRS-Punkte erhöht waren. Auch hier waren die Unterschiede in der Quantität des Expressionsverhaltens nur gering, so dass nicht von diskordanten Fällen die Rede sein kann.

Zu 70,7% (82 Fälle) zeigten Primärtumor und Lymphknoten identische Ergebnisse. Insgesamt waren 4 (3,5%) Fälle diskordant. 3 davon zeigten einen negativen Progesteronrezeptor-Status in der Metastase bei einem IRS-Wert von 2 (2 mal) bzw. 9 (1 mal, siehe Abbildung 11) im Primärtumor.

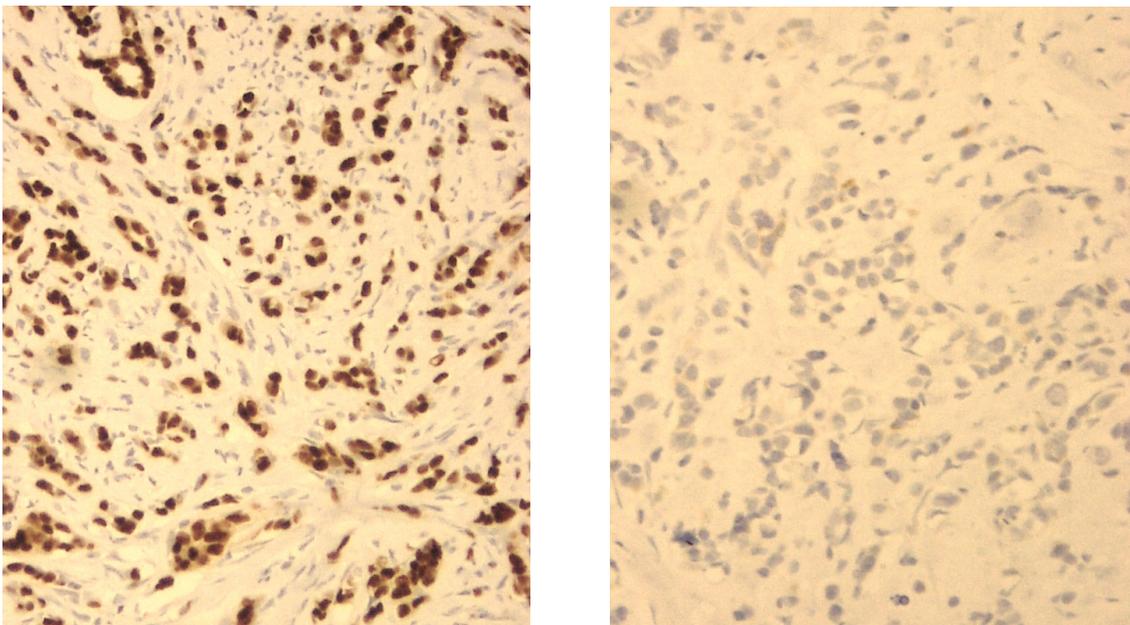


Abbildung 11: Fall 116: Progesteronrezeptor positiver Primärtumor (IRS=9, links) und negative Lymphknotenmetastase (IRS=0, rechts)

Ein negativer Primärtumor bei gleichzeitig positivem Metastasenstatus mit einem IRS von 2 kam nur einmal vor.

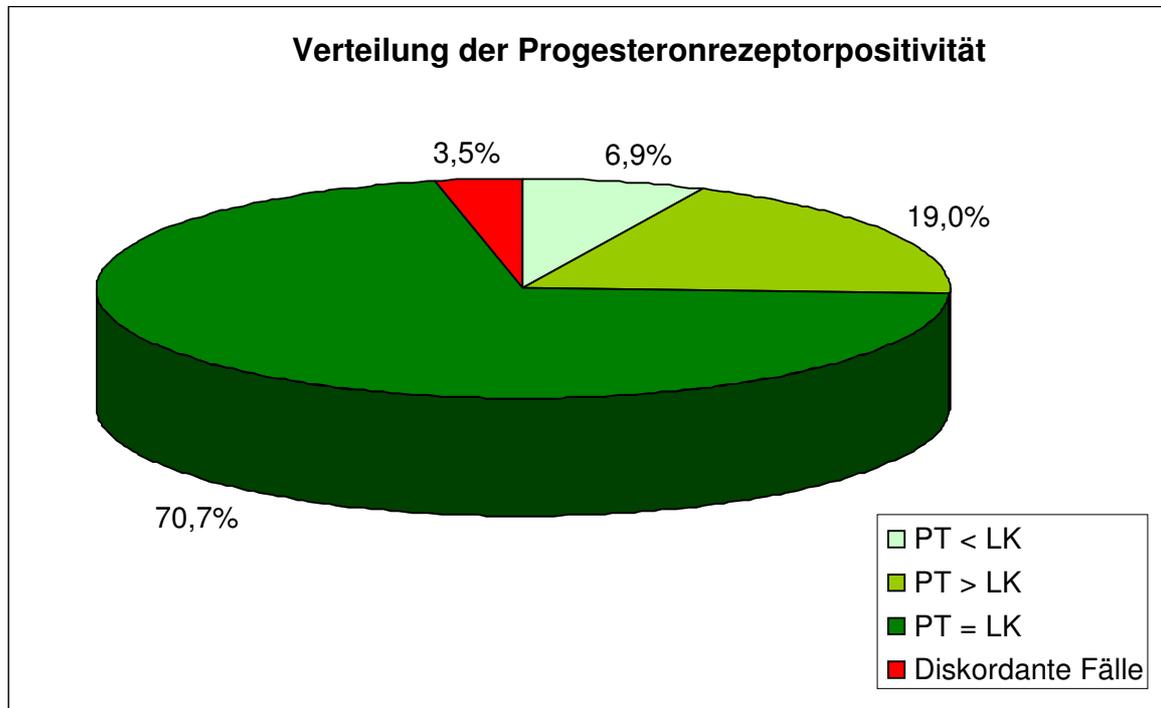


Diagramm 8: Konkordanz des Progesteronwertes zwischen Primärtumor (PT) und Lymphknotenmetastase (LK)

Wie in Diagramm 7 zeigt auch Diagramm 8 die diskordanten Ergebnisse in rot (3,5%; $p = 0,71$). Die konkordanten Ergebnisse stellen sich durch die Summe sämtlicher Grün-Flächen dar. Davon sind die absolut identischen Score-Werte zwischen Primärtumor und Metastase dunkelgrün markiert (70,7%). Die Fälle, in denen der Primärtumor den höheren Wert aufwies, sind in hellgrün (PT > LK), die gegensätzlichen Fälle (PT < LK) in mintgrün gezeichnet.

5 Diskussion

Die Bedeutung und der hieraus resultierende Stellenwert des Mammakarzinoms ist durch dessen Häufigkeit bedingt. Mit unterschiedlichen Behandlungsstrategien soll nach Primärdiagnose des frühen, lokal begrenzten Mammakarzinoms dessen systemische Ausbreitung und somit Metastasierung verhindert werden.

Das HER-2/neu Onkogen nimmt bereits lange einen besonderen Stellenwert in der Vorhersage des Aggressionsverhaltens des Mammakarzinoms ein. Sein Protein, der transmembrane Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu, ist das Ziel der Therapie mit Trastuzumab, ein monoklonaler, humanisierter Antikörper. Trastuzumab wurde anfangs lediglich zur Therapie beim metastasierten, Her-2 positiven Mammakarzinom eingesetzt [48]. Vier große Studien konnten jedoch mittlerweile zeigen, dass durch die Hinzunahme von Trastuzumab in die adjuvante Therapie auch des nichtmetastasierten Mammakarzinoms sehr positive Ergebnisse in Bezug auf die Rückfallrate erreicht werden [77, 83, 87]. Die neuesten Studienergebnisse zeigen, dass Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs, die nach Trastuzumab-Therapie ein Fortschreiten der Erkrankung erleiden, von einer fortgesetzten Trastuzumab-Gabe zusammen mit dem Zytostatikum Capecitabin im Vergleich zur alleinigen Zytostatika-Gabe profitieren [99].

Aktuell besteht eine rege Diskussion über die Bedeutung einer Ko-Amplifikation des Topoisomerase-II- α -Gens, zumal eindeutige Hinweise bestehen, dass der Therapieerfolg mit Anthrazyklinen hiervon abhängig ist [72]. In den 80iger und Beginn der 90iger Jahre erreichten Anthrazykline einen sehr hohen Stellenwert in der systemischen Therapie des Mammakarzinoms. Eine gefürchtete Nebenwirkung blieb neben akut toxischen Einflüssen wie Gewebsdestruktion bei Paravasaten vor allem die kardiale Nebenwirkung. In Vergleichsstudien konnten Heilungsverbesserungen mit anthrazyklinhaltigen Chemotherapeutika im Vergleich zu dem damaligen Standardregime CMF (Cyclophosphamid/ Methotrexat/ 5-Fluoruracil) gezeigt werden [43, 57, 60, 61].

Als die älteste Form der „targeted therapy“ ist ohne Zweifel die „Anti-Hormontherapie“ anzusehen. Die Bestimmung der Hormonrezeptoren am Primärtumor ist als Basisuntersuchung zu fordern. Tamoxifen als bisher wichtigstes Medikament wirkt als Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator (SERM). Allerdings entwickeln einige Tumorzellen eine Resistenz und beginnen erneut zu wachsen. Die Ursachen hierfür sind bisher im Detail nicht bekannt. Eine weitere bedeutende Gruppe in der anti-hormonellen Therapie stellen die Aromataseinhibitoren dar. In groß angelegten Studien wurde deren Überlegenheit gegenüber Tamoxifen mehrfach gezeigt [11, 13, 41, 47].

Um die bestmögliche Behandlungsstrategie finden zu können, wird das Tumorgewebe auf verschiedene biologische Marker untersucht, was heute bereits routinemäßig geschieht. Allerdings werden diese Untersuchungen auch beim metastasierten Mammakarzinom fast ausschließlich am Gewebe des Primärtumors durchgeführt und die entsprechende Therapie davon abgeleitet. Folglich besteht allgemein die Annahme, dass sich der Biomarker-Status während der Progression der Erkrankung nicht verändert. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die Metastasen ein anderes biologisches Verhalten aufweisen als der Primärtumor, insbesondere dann, wenn sie zeitlich gesehen erst viel später auftreten.

Das Ziel dieser Arbeit war der Vergleich des Expressionsverhaltens der biologischen Marker HER-2/neu, Topoisomerase-II- α , Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie zusätzlich des Amplifikationsverhaltens von HER-2/neu und Topoisomerase-II- α zwischen Primärtumor und den jeweiligen ipsilateralen, axillären Lymphknotenmetastasen.

Die Grundlage dieser Untersuchungen bestand aus dem Tumorgewebe von 121 Patientinnen, deren Primärtumoren im Rotkreuzklinikum München - Frauenklinik, unter der Leitung von Prof. Dr. W. Eiermann, im Zeitraum zwischen Dezember 1999 und April 2002 exzidiert wurden. Alle Patientinnen wiesen mindestens eine ipsilaterale Lymphknotenmetastase auf. Im Gegensatz zu vielen vorangegangenen Studien, die die ursprünglichen Paraffin-Blöcke verwendeten [17, 92], wurden in dieser Arbeit durch Herausstanzen repräsentativer

Tumorareale aus den ursprünglichen Tumor- und Metastasengeweben neue Hybridblöcke hergestellt. Dieses Vorgehen gewährleistete identische Verhältnisse bei den Färbeprozessen für Primärtumor und entsprechender Lymphknotenmetastase und somit eine entscheidende Minimierung der Fehlerrate. Daraus resultierte eine hohe Qualität der Vergleichbarkeit zwischen Primärtumor und Metastase. Die vom Primärtumor unabhängige Bewertung der Metastasen in einem separaten Durchgang garantierte eine vom Ergebnis des Primärtumors unbeeinflusste Evaluation der Lymphknoten.

Ein weiterer Vorteil ist die Anwendung verschiedenster Methoden für den Nachweis von HER-2/neu und Topoisomerase-II- α (Immunhistochemie, FISH, CISH). Im Gegensatz zu Studien, die nur mit ein oder zwei unterschiedlichen Nachweismethoden arbeiteten [17, 27], konnten in dieser Analyse die Ergebnisse der einen Methode durch die anderen beiden Verfahren bestätigt oder relativiert werden. Durch Wiederholung des Färbeporgangs sämtlicher diskordanter Fälle wurden technische Fehler diesbezüglich ausgeschlossen.

Die diskordanten Fälle können prinzipiell mit dem biologischen Phänomen der Tumorerogenität erklärt werden. Wenn auch eher selten, so kann es doch vorkommen, dass eine Ansammlung eines Zellklons zum Beispiel in einem Her-2 negativen Tumorgewebe Her-2 überexprimiert und darüber hinaus die Fähigkeit besitzt zu metastasieren. Dieser neoplastische Klon kann im Tumorgewebe so klein sein, dass er bei der Aufbereitung des Gewebes nicht angeschnitten und deshalb auch nicht diagnostizierbar ist. In diesem Fall würde der Tumor auf eine Trastuzumab-Therapie nicht ansprechen, die von dem Klon ausgehenden Metastasen aber möglicherweise schon. Andererseits wäre es auch möglich, dass beim Stanzen der Blöcke per Zufall nur der negative, nicht exprimierende Tumorteil aus dem Gewebe gestanzt wurde und dadurch das unterschiedliche Expressionsverhalten der biologischen Marker begründet liegt. Auch eine bei der damaligen Aufbereitung erfolgte Überfixation der Lymphknoten ist eine Erklärung für unterschiedliches Expressionsverhalten. Dies hätte ein schlechteres Ansprechen der Färbung im überfixierten Gewebe zur Folge. Das Vorkommen dieses Phänomens bei verschiedenen Untersuchungen (z.B. Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus) desselben Falles (Fall 116) stützt diese Erklärung.

Auch die Auswirkungen einer Chemotherapie können ein Grund sein, dass sich das biologische Verhalten einzelner Zellen verändert. Sollte ausgerechnet von diesen Zellen aus die Metastasierung erfolgen, so würden die histopathologischen Tests unterschiedliche Ergebnisse zwischen Primärtumor und Metastase ergeben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten nur sehr geringe Diskordanzen der jeweiligen biologischen Marker zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase.

Unter den Hormonrezeptoren bestand lediglich eine nicht signifikante Diskordanz von 2,6% ($p = 0,71$) für den Östrogenrezeptor und 3,5% ($p = 0,69$) für den Progesteronrezeptor (siehe Diagramm 7 und Diagramm 8). Es wurde ein Fall beobachtet, der im Primärtumor sowohl für den Östrogenrezeptor, als auch für den Progesteronrezeptor einen Score von 9 IRS-Punkten erreichte, während die Lymphknotenmetastasen in beiden Fällen negativ bewertet wurden. Das umgekehrte Verhalten zeigten die anderen diskordanten Fälle, mit jeweils negativen Werten im Primärtumor bei positiven Werten für die lokoregionären Metastasen.

Die Auswertung des HER-2/neu ergab eine absolute Konkordanz (100%) zwischen Primärtumor- und Metastasengewebe in der Fluoreszenz- und Chromogenen in situ Hybridisierung (FISH und CISH). Auch die Ergebnisse von FISH und CISH zueinander waren absolut konkordant (100%), in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wang et al. (2006), die ebenfalls eine absolute Konkordanz der Ergebnisse von FISH und CISH feststellten [101]. Auffallend ist jedoch, dass 90,9% der im HercepTest 2+ gewerteten Präparate in FISH und CISH amplifiziert waren. Dieses Ergebnis steht an sich nicht in Einklang mit der Literatur, in der von einer Amplifikation in ca. 20-25% der schwach positiven (2+) Fälle berichtet wird [16, 56]. Diese Diskrepanz wird in der angewandten Bewertung des HercepTests begründet. Die Schwelle, um ein Präparat mit 2+ zu bewerten, war in unseren Untersuchungen durch eine gewisse unausweichliche Subjektivität der Betrachter recht hoch angesetzt. Die Ergebnisse aus den Ringversuchen 2001/2002 für die Praxis Dr. Högel, Dr. Dr. Becker und Dr. Beer lagen allerdings für den HercepTest mit 90% weit über dem Durchschnitt

aller teilnehmenden Pathologen (84%) und wurden mit sehr gut bewertet [76]. Speziell bei den HercepTest 1+ Fällen ist auffallend, dass bis zu 23% aller anderen Teilnehmer diese Fälle mit 2+ bewerteten, während die Gemeinschaftspraxis Dr. Högel jeden Fall korrekt als negativ beurteilte. Die in der Literatur beschriebene Rate von 20-25% falsch-positiven Ergebnissen (HercepTest 2+, nicht amplifiziert in FISH und CISH) ist also als ein Nebeneffekt der großzügigen und dabei teilweise falsch-positiven Bewertung negativer, meist 1+ Fälle anzusehen, wohingegen die niedrige Rate falsch-positiver 2+ Fälle in dem Kollektiv dieser Arbeit als besonders exakte Bewertung zu interpretieren ist.

Die immunhistochemische HER-2/neu Bestimmung mittels HercepTest lieferte eine sehr geringe Anzahl diskordanter Ergebnisse. Von 117 auswertbaren Präparaten zeigten 113 (96,6%) ein konkordantes Verhalten in Primärtumor und Metastase. 3 der 4 diskordanten Fälle zeigten in Primärtumor und Lymphknotenmetastase eine Amplifikation, obwohl in der Immunhistochemie nur die Metastase positiv gewertet wurde.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Gong et al (2005) in einer Studie mit 60 Patientinnen (43 lokoregionäre Rezidive und 17 distanten Metastasen). 42 von 43 (98%) und 16 von 17 (94%) der lokoregionären und distanten Metastasen zeigten ein konkordantes Ergebnis des HER-2 Status zum Primärtumor [33]. Auch Gancberg et al (2002) berichtet über 94% und 93% Konkordanz des HER-2 Status zwischen Primärtumor und distanten Metastasen (Immunhistochemie und FISH) [27]. Regitnig et al (2004) erzielten zwar absolute Konkordanz zwischen Primärtumor und lokoregionären Lymphknotenmetastasen, allerdings berichten sie von einer Diskordanz in 48,4% zwischen Primärtumor und distanter Metastase [74]. Auch Zidan et al (2005) und Santinelli et al (2007) schreiben von Diskordanzen von 14% und 21% zwischen Primärtumor und Fernmetastasen [79, 104].

Trotz des geringen Prozentsatzes an diskordanten Fällen scheint eine Routine Untersuchung der Lymphknotenmetastasen in unseren Augen sinnvoll. Die Patientinnen, die davon profitieren werden, machen zwar in diesem Kollektiv nur einen Anteil von 2,6% für die HER-2 Untersuchung aus, bezogen auf die

Gesamtzahl der an Brustkrebs erkrankenden Frauen in Deutschland sind dies jedoch immerhin ca. 1400 Patientinnen pro Jahr. Ebenso viele Patientinnen könnten von einer Routine-Untersuchung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den metastatischen Lymphknoten und einer dementsprechenden Therapie profitieren. Um genauere Empfehlungen ableiten zu können, sollten unbedingt weitere Untersuchungen mit einem möglichst großen Kollektiv durchgeführt werden. Patientinnen mit lokoregionären oder distanten Metastasen sollten in Untergruppen unterschieden werden. Ebenfalls sollte auch der Zeitpunkt der Therapie nicht vernachlässigt werden, da Varga et al (2005) herausfanden, dass sich der HER-2 Status bei 13% der Patientinnen während der Therapie veränderte [97].

Während bei der Therapie mit Trastuzumab das Bestreben in die Richtung geht, möglichst wenig Patientinnen mit HER-2 positiven Metastasen auszuschließen, geht es bei der Untersuchung der Topoisomerase-II- α vor allem darum, herauszufinden, bei welchen Patienten auf eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie möglicherweise verzichtet werden kann. Da die Nebenwirkungen der Anthrazykline eine nicht zu vernachlässigende Kardiotoxizität sowie leukämische Erkrankungen darstellen können, ist es von außerordentlichem Interesse, diese in Maßen zu halten [62]. Da dieser molekulare Marker den Angriffspunkt der Anthrazykline darstellt, könnten durch den genauen Nachweis der Überexpression und Amplifikation der Topoisomerase-II- α viele Patientinnen vor der für sie wenig effektiven und potentiell kardiotoxischen Anthrazyklintherapie bewahrt werden. Besteht jedoch bei einer Patientin eine Amplifikation und damit Überexpression der Topoisomerase-II- α , ist diese, wie bereits in einigen Arbeiten bestätigt, immer mit einer Amplifikation des HER-2/neu korreliert [17, 45, 52, 72]. Diese Patientin würde einen erheblichen Nutzen aus einer Kombinationstherapie aus Trastuzumab und Anthrazyklinen ziehen. Andererseits zeigten die Daten der BCIRG 006-Studie [83] gleichwertige Heilungsergebnisse (DFS disease free survival) zwischen dem anthrazyklinfreien TCH-Arm (Taxotere-Carboplatin-Herceptin) und dem anthrazyklin- / trastuzumabhaltigen (ACTH, Doxorubicin-Cyclophosphamid-Taxotere-Herceptin) -Arm bei den Topoisomerase-II- α -nicht amplifizierten Patientinnen. Dies bedeutet, dass bei den Topoisomerase-II- α -nicht

amplifizierten, jedoch Her-2-amplifizierten Patientinnen möglicherweise auf die Anthrazykline gänzlich verzichtet werden könnte.

Da auch hierbei unbedingt der Status der Metastasen bedacht werden sollte, wurde der Nachweis der Topoisomerase-II- α in die Untersuchung der Tumorgewebe und ihrer entsprechenden Lymphknotenmetastasen mit einbezogen.

Die immunhistochemische Untersuchung der Topoisomerase-II- α erwies sich als recht schwierig. Laut Angaben des Herstellers der Antikörper (DCS, Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg) wurde der Schwellenwert der Positivität bei 20% dunkelbraun gefärbter Zellkerne festgelegt. Allerdings ist dies ein Wert, der bei der Betrachtung unter dem Mikroskop nur gemittelt werden kann. Zwischen 17% und 23 % kann unter dem Mikroskop kein Unterschied gemacht werden (vergleiche Abbildung 8). Somit ist der Anteil an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen relativ hoch. Um diesem Problem bestmöglichst auszuweichen, wurden repräsentative Ausschnitte fotografiert und am Computerbildschirm ausgezählt. Innerhalb dieses Ausschnittes bestand zwar eine relativ hohe Reproduzierbarkeit, jedoch nimmt die Wahl des Ausschnittes entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Mit dieser Methode wurden 10 von 116 Patientinnen-Fällen für Topoisomerase-II- α überexprimiert befunden. Die Diskordanz zwischen Primärtumor und Lymphknoten betrug 3,5% ($p = 0,46$).

Da die Amplifikation der Topoisomerase-II- α in HER-2/neu nicht-amplifizierten Fällen wie bereits weiter oben erwähnt in der Literatur schon mehrfach widerlegt wurde [17, 45, 52, 72], wurden die in situ Hybridisierungen der Topoisomerase-II- α nur auf die HER-2/neu positiven Fälle beschränkt.

Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurden nur 3 Fälle detektiert, die für Topoisomerase-II- α amplifiziert waren. Im Gegensatz dazu konnten bei der Chromogenen in situ Hybridisierung 13 amplifizierte Fälle beobachtet werden, darunter 9, die in der Immunhistochemie ebenfalls positiv waren. Die restlichen 4 amplifizierten Fälle zeigten in der Immunhistochemie einen Wert von 15% +/- 2%, womit wieder auf das Problem des Schwellenwertes für Positivität hingewiesen sei. Prozentual sind laut Chromogener in situ Hybridisierung 44,8% der HER-

2/neu amplifizierten Fälle ebenfalls für Topoisomerase-II- α amplifiziert. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Studienergebnis von Tanner et al. (2001), die von 46% Topoisomerase-II- α -Amplifikation berichten [92]. Die Konkordanz zwischen Primärtumor und Lymphknoten lag für FISH und CISH bei 100%, den Ergebnissen von Durbecq et al. (2003) entsprechend [17]. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnte in dieser Studie nicht alle amplifizierten Präparate detektieren. Es muss von technischen Mängeln ausgegangen werden, obwohl das Vorgehen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung exakt dem Vorgehen bei der HER-2/neu-Bestimmung entsprach, welche erfolgreich durchgeführt und bewertet werden konnte. Ein Defekt der Sonde kann ausgeschlossen werden, da die Positiv-Kontrollen in jedem Färbedurchlauf die entsprechende Amplifikation aufwiesen.

Trotz positiver Erwartungen bezüglich des Stellenwertes der Topoisomerase-II- α sollten die Ergebnisse aus weiteren Studien abgewartet werden, um diesen beurteilen zu können. Damit eine sinnvolle, aussagekräftige histologische Untersuchung des Expressions- und Amplifikationsgrades der Topoisomerase-II- α gewährleistet werden kann, wird es notwendig sein, die Diagnostik weiter zu verbessern. Insbesondere der Schwellenwert der Positivität sollte einheitlich auf einen Wert festgelegt werden, der vom Pathologen unter dem Mikroskop ermittelt werden kann. Erst dann ist eine zielgerichtete und limitierte Anwendung der Anthrazykline, auch wenn diese im Moment aus der adjuvanten Standardtherapie noch nicht wegzudenken sind, ein Ziel, das vor allem zur Vermeidung unnötiger Nebenwirkungen bei unwirksamer Therapie angestrebt werden sollte.

6 Zusammenfassung

Die Diagnose Brustkrebs betrifft jährlich etwa 55.150 Frauen in Deutschland. Das Mammakarzinom stellt somit die häufigste Krebsneuerkrankung und Krebstodesursache der Frau dar. Die Wahl der geeigneten Therapie wird für das metastasierte Mammakarzinom anhand des pathologisch untersuchten Gewebes des Primärtumors getroffen. Die Untersuchung der biologischen Marker von Fern- und lokoregionären Lymphknotenmetastasen wird routinemäßig nicht durchgeführt. Dies beruht auf der Annahme, dass sich der histopathologische Charakter des Tumors in den Metastasen widerspiegelt, und sich selbst bei Metastasierung nach einigen Jahren nicht verändert.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Konkordanz des Expressionsverhaltens von HER-2/neu, Topoisomerase-II- α und den Hormonrezeptoren Östrogen- und Progesteronrezeptor in Geweben von Primärtumor und Lymphknotenmetastase von 121 Patientinnen mit mindestens einer ipsilateralen axillären Lymphknotenmetastase. Zusätzlich wird das Amplifikationsverhalten von HER-2/neu und Topoisomerase-II- α in den HER-2/neu überexprimierten Fällen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Chromogener in situ Hybridisierung analysiert. Die Tumorexzisionen sowie die Lymphknotendissektionen erfolgten im Rotkreuzklinikum – Frauenklinik – München, unter der Leitung von Prof. Dr. W. Eiermann in der Zeit zwischen Dezember 1999 und April 2002.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen Ergebnisse von hoher Konkordanz (97,4% für Östrogenrezeptor, 96,6% für Progesteronrezeptor, 96,6% für HER-2/neu und 96,5% für Topoisomerase-II- α) zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Die Fluoreszenz und Chromogene in situ Hybridisierung (FISH und CISH) zeigen sowohl für HER-2/neu als auch für Topoisomerase-II- α eine absolute (100%) Konkordanz zwischen Primärtumor und Lymphknoten. Bezüglich des HER-2/neu sind die Ergebnisse von FISH und CISH untereinander zu 100% konkordant. Im Gegensatz dazu detektiert CISH deutlich mehr Topoisomerase-II- α -amplifizierte Fälle als FISH (13 vs. 3).

Eine Routine-Untersuchung der metastatischen Lymphknoten auf HER-2/neu ist trotz der hohen konkordanten Ergebnisse sinnvoll. Dies betrifft zwar nur einen geringen prozentualen Anteil im vorliegenden Kollektiv (2,6%), pro Jahr sind dies allerdings ca. 1400 Patientinnen in Deutschland. Weitere 1500 Patientinnen könnten von einer Hormonrezeptorbestimmung der Lymphknoten profitieren.

Um eine Beurteilung des Stellenwertes der Topoisomerase-II- α zu ermöglichen, sollte deren Auswertung durch weitere Studien verbessert und standardisiert werden. Erst dann kann das Ziel der gerichteten und limitierten Anwendung von Anthrazyklinen zur Vermeidung unnötiger Nebenwirkungen angestrebt und verwirklicht werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die HER-2 Gen-Amplifikation resultiert in einer kontinuierlichen Überexpression des HER-2 Proteins auf der Zelloberfläche [86].....	13
Abbildung 2: Nachbarschaft von HER-2 und Topoisomerase-II- α auf Chromosom 17 [83].....	15
Abbildung 3: Hybridblöcke aus Primärtumor- und Lymphknotengewebe.....	28
Abbildung 4: Objektträger mit je 2 Primärtumor- und Metastasenstanzen (Fall 22 und 23, hier bereits mit HercepTest gefärbt).....	29
Abbildung 5: HER-2/neu Amplifikation erkennbar durch viele braune Punkte pro Zelle (links) und Cluster (rechts)	39
Abbildung 6: Diskordantes Ergebnis (Fall 80): Primärtumor HER-2/neu negativ (1+, oben), Lymphknotenmetastase positiv (3+, unten)	46
Abbildung 7: HER-2/neu hoch amplifizierter Primärtumor (oben) und Lymphknoten-metastase (unten), Fall 50.....	48
Abbildung 8: Überexpression (22,8%) der Topoisomerase-II- α im Primärtumor (links), negative Lymphknotenmetastase (15%) (Fall 84)	51
Abbildung 9: Amplifikation der Topoisomerase-II- α im Primärtumor von Fall 73.	52
Abbildung 10: Fall 70: Östrogenrezeptor negativer Primärtumor (IRS=0; links) und positive Metastase (IRS=4; rechts)	54
Abbildung 11: Fall 116: Progesteronrezeptor positiver Primärtumor (IRS=9, links) und negative Lymphknotenmetastase (IRS=0, rechts)	56

8 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Prozentualer Anteil der Altersklassen.....	43
Diagramm 2: Absolute Verteilung des histologischen Tumortyps.....	44
Diagramm 3: Expressionsverhalten des HER-2/neu in Primärtumor und Metastase	47
Diagramm 4: Überexpression und Amplifikation des HER-2/neu	49
Diagramm 5: Expressionsverhalten der Topoisomerase-II- α zwischen Primärtumor und Metastase.....	52
Diagramm 6: Überexpression und Amplifikation der Topoisomerase-II- α	53
Diagramm 7: Konkordanz des Östrogenrezeptorwertes zwischen Primärtumor (PT) und Lymphknotenmetastase (LK)	55
Diagramm 8: Konkordanz des Progesteronwertes zwischen Primärtumor (PT) und Lymphknotenmetastase (LK)	57

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome [103]	6
Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms [96].....	9
Tabelle 3: Kriterien des Gratings für das Mammakarzinom nach Elston und Ellis [21].....	10
Tabelle 4: Tabelle zur Berechnung des χ^2	41
Tabelle 5: Überexpression des HER-2/neu Rezeptors.....	47

10 Literaturverzeichnis

- 1 **AGO Gravenbruch (2007)** Leitlinien für die Behandlung des primären und des metastasierten Mammakarzinoms: www.ago-online.de
- 2 **Andersen JA** (1974) Lobular carcinoma in situ. A long-term follow-up in 52 cases. Acta Pathol Microbiol Scand [A] 82: 519-533
- 3 **Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister** in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (2006) Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Auflage. Saarbrücken
- 4 **Ataseven B** (2008) Sentinellymphknotenbiopsie vor Primär Systemischer Therapie? Onkologie heute 1: 19-20
- 5 **Ataseven B, Eiermann W** (2006) Mammakarzinom. Dtsch Med Wochenschr 131:1091-1099
- 6 **Bieber-Michler S** (1986) Klinische Untersuchungen zum Metastasierungsverhalten des Mammakarzinoms. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 7 **Boenisch T** (2003) Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Aufl., DakoCytomation Corporation, Carpinteria, DakoCytomation GmbH, Hamburg , 5-79

- 8 **Carlomagno C**, Perrone F, Gallo C et al. (1996) *cerbB-2* overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14: 2702–2708
- 9 **Carter CL**, Allen C, Henson DE (1989) Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-187
- 10 **Champoux JJ** (2001) DNA topoisomerase structure, function, and mechanism. *Ann Rev Biochem* 70: 369-413
- 11 **Coates AS**, Keshaviah A, Thurlimann B et al. (2007) Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 25(5): 486–492
- 12 **Cobleigh MA**, Vogel CL, Tripathy D et al. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648
- 13 **Coombes RC**, Kilburn LS, Snowdon CF et al. (2007) Intergroup Exemestane Study. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2–3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 369 (9561): 559–570, Erratum in: *Lancet* 369 (9565): 906

- 14 **Coon JS**, Marcus E, Gupta-Burt S et al. (2002) Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline based therapy in locally advanced breast cancer. Clin Cancer Res 8: 1061-1067

- 15 **Coussens L**, Yang-Feng TL, Liao YC et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 230:1132-1139

- 16 **Dellmann A**, Arnholdt H, Bollmann R et al. (2002) HER2-Überexpression: Korrelation von IHC und FISH an 622 Mammakarzinomen. Ergebnisse der "HER 2002-Multicenter Studie"

- 17 **Durbecq V**, DiLeo A, Cardoso F et al. (2003) Comparison of topoisomerase II α gene status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. Breast Cancer Res Treat 77: 199-204

- 18 **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTGC)** (2005) Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. Lancet 366:2087-2106

- 19 **EC working group on breast screening pathology** (2001) Quality assurance guidelines for pathology in mammography screening-non operative diagnosis. In: Perry N, Broders M, de Wolf C, Törnberg S, Schouten J (eds) European guidelines for quality assurance in mammography screening. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp 159-172

- 20 Ellis IO**, Galea M, Broughton N et al. (1992) Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20: 479-489
- 21 Elston CW**, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410
- 22 Ernster VL**, Ballard-Barbash R, Barlow WE et al. (2002) Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst* 94 (20): 1546-1554
- 23 Ferlay J**, Bray F, Pisani P et al. (2001) GLOBOCAN 2000: Cancer incidence worldwide, Version 1.0 IARC Cancer BASE No.5. IARC Press. [URL: http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html](http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html)
- 24 Ferlay J**, Bray F, Sankila R et al. (2004) GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 2.0. IARC Press, Lyon
- 25 Fisher ER**, Anderson S, Redmond C et al. (1993) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 71: 2507-2514
- 26 Fossati R**, Confalonieri C, Torri V et al. (1998) Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: A systemic review of published randomised trials involving 31510 women. *J Clin Oncol* 16:3439-3460

- 27 Gancberg D**, Di Leo A, Cardoso F et al. (2002) Comparison of HER2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. Ann Oncol 13:1036-1043
- 28 Gebrauchsanleitung von ZytoDotSPEC HER2 Probe Kit** (2006) ZytoVisionGmbH, Bremerhaven, Produktnr.: C-3003
- 29 Gebrauchsanleitung zum Vysis PathVision Mammakarzinom HER-2/neu Test** (2006) Abbott Molecular Inc., Illinois, Produktnr. 30-161060 / 35-161060 / 36-161060
- 30 Gianni L**, Baselga J, Eiermann W et al. for the ECTO Study Group (2002) First report of the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): effects of primary systemic therapy (PST) on local-regional disease. Proc ASCO 21: 34a, abstract 132
- 31 Goldhirsch A**, Glick J, Gelber RD et al. (2005) Meeting highlights: International consensus on the primary therapy of early breast cancer. Ann Oncol 16:1569-1583
- 32 Goldhirsch A**, Wood WC, Gelber RD et al. (2007) Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. Ann Oncol 18 (7): 1133-1144
- 33 Gong Y**, Booser DJ, Sneige N (2005) Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. Cancer 103:1763-1769

- 34 Gulden J** (2002) Mit Antikörpern gegen Onkoproteine. Cancer Care, Urban und Vogel, Medien und Medizin Verlagsgesellschaft, München, 22: 6
- 35 Haagensen CD**, Lane N, Lattes R (1972) Neoplastic proliferation of the epithelium of the mammary lobules: adenosis, lobular neoplasia, and small cell carcinoma. Surg Clin North Am 52: 497-524
- 36 Haagensen CD**, Lane N, Lattes R, et al. (1978) Lobular neoplasia (socalled lobular carcinoma in situ) of the breast. Cancer 42: 737-769
- 37 Harris L**, Fritsche H, Mennel R et al. (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol 25 (33): 5287-5312
- 38 HercepTest package insert** (2004) DacoCytomation, Denmark A/S, Produktnr.: 105073-003
- 39 Heuson JC**, Longeval E, Mattheiem WH et al. (1977) Significance of quantitative assessment of estrogen receptors for endocrine therapy in advanced breast cancer. Cancer 39: 1971-1977
- 40 Höppel N** (2004) Leitlinienorientierte Therapie des Mammakarzinoms: Kontroversen in der individuellen Betreuung. Deutsche Zeitschrift für Onkologie 36: 4-8
- 41 Howell A**, Cuzick J, Baum M et al. (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. Lancet 365(9453): 60–62

- 42 Hsu SM**, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 29:577-580
- 43 Hutchins LF**, Green SJ, Ravdin PM et al (2005) Randomized, controlled trial of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil with and without tamoxifen for high-risk, node negative breast cancer: treatment results of Intergroup Protocol INT-0102. *J Clin Oncol* 23(33): 8313–8321
- 44 Järvinen TAH**, Liu ET (2003) HER-2/neu and topoisomerase II α genes, targets for chemotherapy. *Comb Chem High Through Scr* 6: 455-470
- 45 Järvinen TAH**, Tanner M, Bärlund M et al. (1999) Characterization of topoisomerase II α gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 142-150
- 46 Järvinen TAH**, Tanner M, Rantanen V et al. (2000) Amplification and deletion of topoisomerase-II- α associate with erbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase-II- α inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol* 156: 839-847
- 47 Jakesz R**, Jonat W, Gnant M et al. (2005) Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 366(9484): 455–462
- 48 Janni W**, Gerber B, Sommer H et al. (2005) Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms. *Deutsches Ärzteblatt* 41: A2795-A2804

- 49 Jonat W**, Maass H (1982) Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe : methodische und klinische Aspekte von Steroidhormonrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung des Mammakarzinoms. F. Enke, Stuttgart
- 50 Kaufmann M**, Costa S, Scharl A (2003) Die Gynäkologie, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- 51 Kaufmann M**, Von Minckwitz G (1996) Das primäre Mammakarzinom. Vorschläge und aktuelle Aspekte zur adjuvanten systemischen Therapie. Dt. Ärzteblatt 93: A-755-A-758
- 52 Keith WN**, Douglas F, Wishart GC et al. (1993) Co-amplification of erbB2, topoisomerase II alpha and retinoic acid receptor alpha genes in breast cancer and allelic loss at topoisomerase I on chromosome 20. Eur J Cancer 29A:1469-1475
- 53 Klinga M**, Kaufmann M, Runnebaum B (1984) Steroidrezeptoren beim Mammakarzinom. In: Neue Konzepte der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. Herausgegeben von: Kubli F Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 217-225
- 54 Konecny G**, Pauletti G, Pegram M et al. (2003) Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. J Natl Cancer Inst 95: 142-153
- 55 Kubista E**, Remenyi M (2006) Leitlinien zur Prävention, Früherkennung und Behandlung des Mammakarzinoms der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO). Speculum 2: 33-40

- 56 Lebeau A**, Deimling D, Kaltz C et al. (2001) HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ Hybridisation. *J Clin Oncol* 19 (2):354-363
- 57 Levine MN**, Bramwell VH, Pritchard KI et al. (1998) Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 16 (8): 2651–2658
- 58 Löffler G**, Petrides P, Montenarh M, Brandt U, Hasilik A (2007) 8. Auflage Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- 59 Manual Mammakarzinome** (2007), Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 11. überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York
- 60 Martin M**, Villar A, Sole-Calvo A et al. (2003) Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i. v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i. v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol* 14(6): 833–842
- 61 Mouridsen H**, Andersen J, Andersson M et al. (1999) Adjuvant anthracycline in breast cancer. Improved outcome in premenopausal patients following substitution of methotrexate in the CMF combination with epirubicin. *Proc ASCO* 18: abstr 254

- 62 Mundhenke C** (2008) Pro adjuvante Anthrazyklin-freie Chemotherapie (2008) Onkologie heute 1:26-30
- 63 National Institutes of Health Consensus Development Panel** (2001) National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3. J Natl Cancer Inst Monogr 30: 5-15
- 64 Oechsle K, Bokemeyer C** (2004) Kardiotoxizität und ihre therapeutischen Optionen. Fortbildungsreihe Supportivtherapie, Folge 35. Im Focus Onkologie 10:50-55
- 65 Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB et al.** (2004) Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. Acta Oncol 43 (1):35-42
- 66 Osborne CK** (1990) Receptors. In: Breast Diseases, 2nd Edition. Herausgegeben von: Harris J, Hellman IC, Kinne D. JB Lippincott Company. Philadelphia: 214-229
- 67 Ott OJ, Pötter R, Hildebrandt G et al** (2005) Teilbrustbestrahlung beim Mammakarzinom mit günstigen prognostischen Faktoren: 3-Jahres-Ergebnisse der deutsch- österreichischen Phase II-Studie Fortschr Röntgenstr 177: 962-967
- 68 Pauletti G, Godolphin W, Press MF** (1996) Detection and quantitation of HER- 2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridisation. Oncogene 13:63-72

- 69 Press MF**, Bernstein L, Thomas PA et al. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15: 2894-2904
- 70 Press MF**, Cordon-Cardo C, Slamon DJ (1990) Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogenes* 5: 953-962
- 71 Press MF**, Hung G, Godolphin W et al. (1994) Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 54:2771-2777
- 72 Press MF**, Sauter G, Buyse M et al. (2007) ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Alteration of topoisomerase II-alpha Gene in human breast cancer and its association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 25 (18S, June 20 Supplement): 524
- 73 Pritchard KI**, Shepherd LE, O'Malley FP et al. (2006) HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 354: 2103–2111
- 74 Regitnig P**, Schippinger W, Lindbauer M et al. (2004) Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol* 203:918-926

- 75 Remmele W**, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe* 8 (3):138-140
- 76 Ringversuch** „Immunhistologische Qualität bei Mammakarzinomen“ 2001/2002 des Berufsverbandes Deutscher Pathologen und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Ergebnismitteilung vom 07.06.2002
- 77 Romond EH** et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353 (16): 1673-1684
- 78 Sachs L** (1999) *Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden*, 9., überarbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- 79 Santinelli A**, Pisa E, Stramazzotti D et al. (2007) HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer* 122 (5):999-1004
- 80 Shek LL**, Gogolpin W (1989) Survival with breast cancer: the importance of estrogen receptor quantity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 243-250
- 81 Slamon DJ** (2007) 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium 2006. *Breast Cancer Research and Treatment* 103 (1):115-124
- 82 Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG et al. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182

- 83 Slamon D**, Crown J, Pienkowski T et al. (2006) BCIRG 006: 2nd interim analysis phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER-2 positive early breast cancer patients. SABCS abstr. 52
- 84 Slamon DJ**, Godolphin W, Jones LA et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244: 707-712
- 85 Slamon DJ**, Leyland-Jones B, Shak S et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. N Engl J Med 344:783-792
- 86 Sliwkowski MX**, Lofgren JA, Lewis GD et al. (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). Semin Oncol. 26 (suppl 12):60-70.
- 87 Smith I** et al. (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. Lancet 369 (9555): 29-36
- 88 Stern DF**, Heffernan PA, Weinberg RA (1986) p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. Mol Cell Biol 6: 1729-1740

- 89 Sternberger LA**, Hardy PH Jr, Cuculis JJ (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 18:315-313
- 90 Strebhardt K**, Faltus T (2005) Geniale Abschalter für Brustkrebsgene: Hemmung des Tumorwachstums durch DNA-Interferenz. *Forschung aktuell* 1:58-62
- 91 Tanner M**, Gancberg D, Di Leo A et al. (2000) Chromogenic in situ Hybridisation: a practical alternative for fluoreszenz in situ Hybridization to detect HER-2/neu oncogen amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 157 (5):1467-1472
- 92 Tanner M**, Järvinen P, Isola J (2001) Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II alpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 61: 5345-5348
- 93 The National Cancer Institutes of Health Consensus Development Conference** (2001) adjuvant therapy for breast cancer. Bethesda, Maryland, USA, November 1-3, 2000, proceedings. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 30:1-152
- 94 Thorpe SM**, Rose C, Rasmussen BB et al. (1987) Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 47: 6126-6133

- 95 Tsuda H**, Hirohashi S, Shimosato Y et al. (1989) Correlation between longterm survival in breast cancer patients and amplification of two-putative oncogene co-amplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res* 49: 3104-3108
- 96 UICC** (2002) TNM classification of malignant tumours, 6th ed. Wiley-Liss, Inc, New York
- 97 Varga Z**, Caduff R, Pestalozzi B (2005) Stability of the HER2 gene after primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Virchows Arch* 446: 136-141
- 98 Vogel C**, Cobleigh M, Tripathy D et al. (2000) First-line, non-hormonal treatment of women with HER2 overexpressing metastatic breast cancer with Herceptin (trastuzumab, humanized anti-HER-2 antibody). *Proc Am Soc Clin Oncol* 19: 71a (Abstract 275)
- 99 Von Minckwitz G** et al. (2008) Capecitabine vs. capecitabine + trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing during trastuzumab treatment: The TBP phase III study (GBG 26/BIG 3-05). *J Clin Oncol* 26 (May 20 suppl) abstr 1025
- 100 Wang JC** (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-440
- 101 Wang LP**, Huang O, Shen KW et al. (2006) Chromosome in situ Hybridisation (CISH): 145 cases of HER-2 status evaluation in chinese people. San Antonio Breast Cancer Symposium, 5018

- 102 Wheeler JE**, Enterline HT (1976) Lobular carcinoma of the breast in situ and infiltrating. *Pathol Annu* 11: 161-188
- 103 WHO** (2003) World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs In: Tavassoli FA, Devilee P (eds). IARC Press, Lyon, pp 9-112
- 104 Zidan J**, Dashkovsky I, Stayerman C et al. (2005) A Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer* 93: 552-556

11 Danksagung

Meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Eiermann und Herrn Prof. Dr. med. E. R. Weissenbacher gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Frau Dr. med. Beyhan Ataseven danke ich herzlich für die überaus freundliche und hilfsbereite Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. med. Bernhard Högel und Frau Dr. Michaela Beer danke ich besonders herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Gemeinschaftspraxis Pathologie Dr. med. B. Högel, Dr. Dr. med. C. Becker und Dr. med. M. Beer und für die außerordentlich geduldige und immer freundliche Anleitung bei der Bearbeitung der pathologischen Fragestellungen.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Stefanie Böck, Frau Jessica Meixner und Frau Sabine Steidle für die zeitaufwändige Unterstützung bei der Aufarbeitung der Präparate bedanken.

Meiner Mutter Dr. Stefanie Bieber-Michler und meinem Mann Corin Gologan danke ich nicht zuletzt für die zahlreichen Korrekturvorschläge zu Form und Inhalt der vorliegenden Arbeit sowie für die geduldige Unterstützung beim Umgang mit den Widerspenstigkeiten des Computers.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gologan, Daniela Mirjam, geb. Michler
 Wohnort: München
 Geburtsdatum: 02. 10. 1980 in Münster
 Eltern : Werner Michler, Architekt
 Dr. Stefanie Bieber-Michler, geb. Bieber, Zahnärztin
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Konfession: römisch katholisch

Schulbildung

1987 – 1991 **Grundschule Heimstetten**
 1991 – 1998 **Gymnasium Kirchheim**
 1998 – 1999 **Parish Hill High School, CT, USA**
 Abschluss: High School Graduation
 1999 – 2001 **Gymnasium Kirchheim**
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,9)

Studium

10/2001 – 10/2003 **Ludwig-Maximilian-Universität München**
 Studium der Humanmedizin
 11/2003 – 1/2008 **Ludwig-Maximilian-Universität München**
 Studium der Zahnmedizin
 Staatsexamen bestanden am 30.01.2008

Beruflicher Werdegang

4/2008 – dato **Vorbereitungsassistentz** Praxis Dr. Bieber-Michler,
 Heimstetten
 7/2008 – 10/2008 **Vorbereitungsassistentz** Praxis Dr. Schmidmer,
 München

München, den 3. März 2009