

**Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

**Evaluation der HER-2/neu-Genamplifikation an  
Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen mittels  
FISH und deren Wertigkeit im Vergleich zur  
immunhistochemischen membranassoziierten  
Proteinüberexpression**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Sina Herzog  
aus  
Ludwigsburg**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wallwiener

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann

# INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms	1
1.2.1 Familiäre Disposition	1
1.2.2 Hormonelle Faktoren	2
1.2.3 Biologische Faktoren	2
1.2.4 Exogene Faktoren	3
1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren	3
1.3.1 Prognostische Faktoren	3
1.3.2 Prädiktive Faktoren	5
1.4 HER-2/neu	5
1.4.1 Onkogene und Proto-Onkogene	5
1.4.2 HER-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren	6
1.4.3 Genamplifikation und Proteinüberexpression	7
1.4.4 Prognostische und prädiktive Relevanz	9
1.4.5 Trastuzumab (Herceptin®)	10
1.4.6 Diagnostische Methoden	11
1.5 Fragestellung	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>14</b>
2.1.1 Mammakarzinomgewebe	14
2.1.2 Kit	16
2.1.3 Chemikalien	16
2.1.4 Lösungen	16
2.1.5 Geräte	17
2.1.6 Verbrauchsmaterial	18
2.1.7 Sonstiges	18

<b>2.2 Methoden</b>	<b>19</b>
2.2.1 Tumorabklatschpräparate	19
2.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	19
2.2.2.1 Grundlagen	19
2.2.2.2 HER-2/neu DNA Sonden-Kit	22
2.2.2.3 Durchführung	22
2.2.2.4 Auswertung	25
2.2.3 Immunhistochemie	29
2.2.3.1 Grundlagen	29
2.2.3.2 Paraffinschnitte	31
2.2.3.3 Antikörper	31
2.2.3.4 Auswertung	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	33
3.1.1 FISH-Ergebnisse	33
3.1.2 Vergleich der HER-2/CEP17-Ratio bei unterschiedlicher Anzahl der ausgewerteten Tumorzellkerne	37
3.2 Immunhistochemie	40
3.2.1 IHC-Ergebnisse	40
3.3 Vergleich der Proteinüberexpression und Genamplifikation von HER-2/neu	41
3.3.1 Vergleich der Ergebnisse des Dako-HercepTest-Scores mit der HER-2/CEP17-Ratio	41
3.3.2 Vergleich der Ergebnisse des Dako-HercepTest-Scores mit der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern	42
3.3.3 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0	43
3.3.4 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 1+	44
3.3.5 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+	46
3.3.6 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+ - 3+	47
3.3.7 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 3+	47
3.4 Polyploidie und HER-2/neu-Status	49

<b>4. Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	51
4.1.1 FISH am Tumorabklatschpräparat	51
4.1.2 Vor- und Nachteile der FISH	52
4.1.3 FISH zur Bestimmung des HER-2/neu-Status	53
4.2 Immunhistochemie	54
4.2.1 IHC am Paraffinschnitt	54
4.2.2 Vor- und Nachteile der IHC	55
4.2.3 IHC zur Bestimmung des HER-2/neu-Status	56
4.3 Vergleich von FISH und IHC	57
4.4 Bewertung von FISH und IHC	61
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>84</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	84
7.2 Abbildungsverzeichnis	86
7.3 Tabellenverzeichnis	87
7.4 Zusammenstellung der Ergebnisse und histopathologischen Tumormerkmale	88

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms**

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau in Deutschland. Jährlich erkranken über 46 000 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 19 000 im Alter unter 60 Jahren. Das Mammakarzinom ist für knapp 26% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und für mehr als ein Drittel (36%) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren, mehr als drei Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter an Krebs insgesamt [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002].

### **1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms**

Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell. Genetische, hormonelle und exogene Faktoren sind in unterschiedlichem Ausmaß daran beteiligt.

#### 1.2.1 Familiäre Disposition

5-10% aller Mammakarzinome sind genetisch determiniert [Wilcox-Honnold 1998]. Familiäre Mutationen der beiden Tumorsuppressorgenen BRCA1 auf dem Chromosom 17q [Hall et al. 1990, Narod et al. 1991, Miki et al. 1994] und BRCA2 auf dem Chromosom 13q [Wooster et al. 1994] bewirken einen Funktionsverlust dieser Gene. Dies führt zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Das Risiko von Frauen, deren Mutter oder Schwester an Brustkrebs erkrankt ist, steigt um den Faktor zwei gegenüber Frauen ohne positive Familienanamnese. Bei zwei Erkrankungsfällen unter Verwandten ersten Grades ist eine Risikoerhöhung um das vier- bis sechsfache nachgewiesen worden [Chang-Claude et al. 1994, Chang-Claude et al. 1995, Becher und Chang-Claude 1996].

Frauen mit genetischen Mutationen haben auch ein höheres Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [Easton et al. 1993, Ford et al. 1994, Easton et al. 1995].

### 1.2.2 Hormonelle Faktoren

Die ovariellen Hormone, insbesondere die Östrogene, spielen eine bedeutende Rolle in der Brustkrebsentwicklung [Henderson et al. 1988]. Viele etablierte Risikofaktoren lassen sich als Folge einer verstärkten oder verlängerten Östrogenwirkung interpretieren. So erhöhen eine frühe Menarche sowie eine späte Menopause das Mammakarzinomrisiko ebenso wie Kinderlosigkeit beziehungsweise Geburt des ersten Kindes nach dem 30. Lebensjahr. Auch langjährige orale Kontrazeption und langjährige Östrogensubstitution im Klimakterium führen zu einer mäßigen Risikoerhöhung [Harris et al. 1992, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1996, Kelsey und Bernstein 1996, Ross et al. 2000].

Adipositas und Übergewicht sind vor allem bei postmenopausalen Frauen als Risikofaktor einzustufen [Hunter und Willet 1993, Huang et al. 1997, Brandt et al. 2000], da die Umwandlung des Nebennierenrindenhormons Androstendion zu Östrogen in der Postmenopause hauptsächlich im Fettgewebe stattfindet [Siiteri et al. 1981].

### 1.2.3 Biologische Faktoren

Bestimmte proliferative Vorerkrankungen der Brust, wie beispielsweise die proliferative Mastopathie mit atypischer Hyperplasie, gehen mit einem erhöhten Risiko einher, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Trifft dies darüber hinaus mit einer familiären Vorgeschichte zusammen, ist das Risiko zusätzlich erhöht [Dupont et al. 1993].

### 1.2.4 Exogene Faktoren

Regelmäßiger Alkoholkonsum stellt einen Risikofaktor dar [Willet et al. 1987, Harris et al. 1992], wobei eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beobachten ist [Schatzkin und Longecker 1994]. Auch ionisierende Strahlung hat einen Einfluss auf das Mammakarzinomrisiko. So traten bei Überlebenden der Atombombenabwürfe in Japan gehäuft Brustkrebskrankungen auf [Preston et al. 1987].

Eine Risikosenkung kann durch Steigerung der körperlichen Aktivität erreicht werden [Bernstein et al. 1994, Thune et al. 1997, Rockhill et al. 1999, Friedensreich et al. 2001].

## **1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren**

Die Bestimmung der prognostischen Faktoren beim Mammakarzinom dient dem Ziel, den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv möglichst genau abschätzen zu können. Hiervon unterschieden werden müssen die sogenannten prädiktiven Faktoren, die Therapieerfolg und Therapieansprechen vorhersagen [Harbeck et al. 2001].

### 1.3.1 Prognostische Faktoren

#### Etablierte Prognosefaktoren

Zu den etablierten Prognosefaktoren zählen das TNM-Stadium, die Tumormorphologie, das Grading sowie die Steroidhormonrezeptoren.

Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für Rezidiv und Überleben [Harbeck et al. 2001]. Hierbei korreliert nicht nur die Tatsache, ob ein Befall der axillären Lymphknoten vorliegt, sondern auch die Anzahl befallener Lymphknoten mit dem Rezidivrisiko [Carter et al. 1989]. Die

Tumorgröße korreliert positiv mit dem Risiko der Fernmetastasierung [Cowen et al. 1998]. Obwohl auch schon sehr kleine Tumoren eine Fernmetastasierung aufweisen können, verschlechtert sich die Prognose mit zunehmender Tumorgröße deutlich [Carter et al. 1989].

Auch morphologische Kriterien sind von hoher prognostischer Bedeutung. Definierte Sonderformen, wie beispielsweise tubuläre, papilläre oder muzinöse Karzinome, haben eine signifikant bessere Prognose als duktale. Ein Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin [Harbeck et al. 2001]. Weiterhin besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen histologischem Grading und rezidivfreiem Überleben. Das von Bloom und Richardson (1957) inaugurierte Grading berücksichtigt die Kernpolymorphie, das Wachstumsmuster und die Mitoserate. Die Prognose verschlechtert sich von G1 (hoher Differenzierungsgrad) bis G3 (niedriger Differenzierungsgrad) kontinuierlich [Contesso et al. 1987].

Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren wurde Ende der 70er Jahre etabliert [Knight et al. 1977, Hähnel et al. 1979]. Im Hinblick auf die prognostische Relevanz zeigte sich eine Korrelation zwischen positivem Hormonrezeptorstatus und längerem Überleben [Eskelinen et al. 1992]. Von den Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus haben diejenigen mit positivem Progesteronrezeptorstatus ebenfalls einen Überlebensvorteil [Bernoux et al. 1998].

### Neue Prognosefaktoren

Neben den etablierten Prognosefaktoren werden zahlreiche neue Faktoren hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung untersucht. Nur für wenige dieser Faktoren ist der klinische Nutzen durch entsprechende Publikationen begründet, so dass ihre Bestimmung beim primären Mammakarzinom sinnvoll erscheint.

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) sind tumorassoziierte Proteolysefaktoren, die am Abbau des Tumorstromas und der Basalmembran beteiligt sind und so zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen beitragen [Andreasen et al. 1997]. Hohe Konzentrationen von uPA und/oder PAI-1 im Primärtumor gehen mit einem erhöhten

Rezidivrisiko sowie einer kürzeren Überlebenszeit einher [Foekens et al. 1992, Grondahl-Hansen 1995, Grondahl-Hansen 1997].

Auch die Präsenz disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark gilt als prognostisch relevanter Faktor. Diese Zellen entgehen der klinischen Routinediagnostik (einschließlich der Analyse der axillären Lymphknoten) und sind womöglich für die Fernmetastasierung primär nodal-negativer Mammakarzinome verantwortlich [Braun et al. 2000, Braun et al. 2001, Gerber et al. 2001].

Die prognostische und prädiktive Relevanz des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proto-Onkogens HER-2/neu wird unter 1.4.4 näher erläutert.

### 1.3.2 Prädiktive Faktoren

Die einzigen evidenzbasierten prädiktiven Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand zur Erstellung von Therapiekonzepten beim Mammakarzinom eingesetzt werden sollten, sind der Östrogenrezeptor- und der Progesteronrezeptorstatus (Tamoxifentherapie) sowie der HER-2/neu-Status (Herceptin®-Therapie; siehe 1.4.5) [Harbeck et al. 2001].

## **1.4 HER-2/neu**

### 1.4.1 Onkogene und Proto-Onkogene

Voraussetzung für die Entstehung eines Tumors ist eine Fehlfunktion normaler zellulärer Mechanismen, die zumeist die Wachstumsregulation betreffen.

Onkogene sind von normalen Zellgenen abgeleitet, die Proto-Onkogene genannt werden. Die meisten dieser Gene kodieren für Bestandteile der zelleigenen Signalübertragungswege. Es finden sich hierbei Beispiele fast aller Molekülklassen, die normalerweise in komplexen Transduktionswegen der Weiterleitung von Signalen

dienen, die bei physiologischem Bedarf für die Entstehung und Differenzierung von Zellen sorgen. Durch verschiedene Mutationen können sie sich jedoch so verändern, dass sie verstärkt und somit unphysiologisch aktiv sind. Die Grundtypen genetischer Veränderungen, die ein Proto-Onkogen zum Onkogen machen, umfassen die Punktmutation, die Chromosomentranslokation und die Überexpression durch eine Genamplifikation [Harbeck et al. 2001].

HER-2/neu, auch c-erbB-2 genannt, ist ein Proto-Onkogen mit Lokalisation auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (Genlocus 17q12-21.32) [Coussens et al. 1985, Popescu et al. 1989]. Es kodiert für einen transmembranen Glykoproteinrezeptor mit einem Molekulargewicht von 185 kDa und intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, der eine große Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) aufweist [Padhly et al. 1982, Bargmann et al. 1986, Slamon und Clark 1988, De Potter 1994].

#### 1.4.2 HER-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren

Der HER-2/neu-Rezeptor gehört zu einer Familie von Tyrosinkinase-Rezeptoren mit den vier Subtypen HER-1 (identisch mit EGFR), HER-2, HER-3 und HER-4 [Lupu et al. 1995], die am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung beteiligt sind [Hynes und Stern 1994]. Sie binden zwar unterschiedliche Wachstumsfaktoren, zeigen jedoch alle ein gemeinsames Funktionsprinzip: die Bindung eines extrazellulären Liganden induziert die Aktivierung einer intrazellulären Tyrosinkinase, die spezifische Zielproteine phosphoryliert und dadurch einen komplexen Signaltransduktionsmechanismus in Gang setzt. Dieser beeinflusst die DNA-Transkription, die Proteinbiosynthese und letztendlich die proliferative Aktivität eines Tumors [Hynes und Stern 1994, Lohrisch und Piccart 2001].

### 1.4.3 Genamplifikation und Proteinüberexpression

Normale Brustepithelzellen haben zwei HER-2/neu-Genkopien und zwischen 20 000 und 50 000 HER-2/neu-Rezeptoren. HER-2/neu-überexprimierende Tumorzellen besitzen hingegen bis zu zwei Millionen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche [Slamon und Pegram 2001].

Der HER-2/neu-Rezeptor ist in 20-30% aller Mammakarzinome überexprimiert [Slamon et al. 1987, Slamon et al. 1989a, Press et al. 1993, Revillion et al. 1998]. In den meisten Fällen beruht eine HER-2/neu-Überexpression auf einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens [Hynes und Stern 1994, Pauletti et al. 1996], die in einer frühen Phase der Tumorgenese des Mammakarzinoms auftritt [Barnes et al. 1992, Liu et al. 1992]. Die Amplifikation des HER-2/neu-Gens führt zu einer erhöhten Konzentration von HER-2/neu-mRNA und damit zu einer verstärkten Synthese und Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors an der Zelloberfläche (*Abb. 1*) [Hynes et al. 1989, Hynes 1993]. In der Folge ist die Anzahl der HER-2/neu-Rezeptoren auf der Oberfläche HER-2/neu-positiver Zellen um ein Vielfaches höher als auf normalen Brustepithelzellen [Lewis et al. 1993].

Die Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors hat vermutlich verschiedene Auswirkungen, die zur Onkogenese führen:

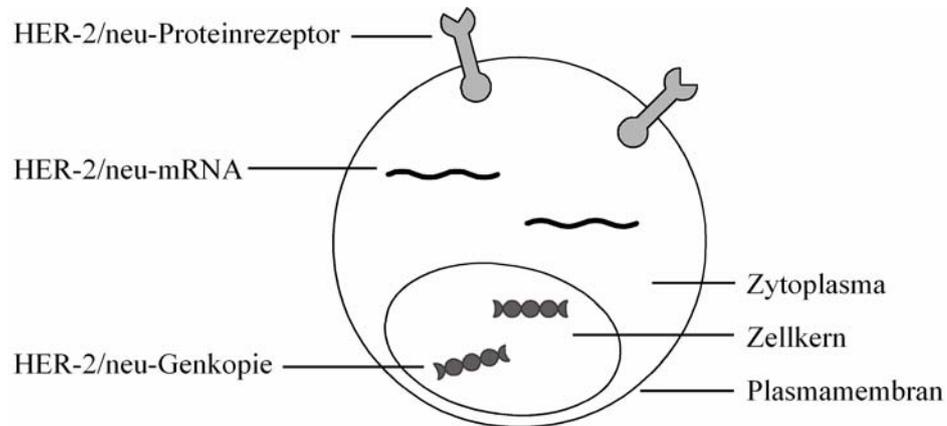
- Verstärkte und verlängerte intrazelluläre Signaltransduktion, ausgehend von HER-2/neu-Heterodimeren [Baulida et al. 1996, Karunakaran et al. 1996, Alroy und Yarden 1997], die nach Bindung eines Liganden durch Dimerisierung zweier benachbarter Rezeptoren entstehen.
- Verstärktes Recycling von HER-1 zur Zelloberfläche, das zu einer verstärkten Signaltransduktion führt [Levkowitz et al. 1998, Klapper et al. 2000].
- Aktivierung und Suppression zahlreicher Signaltransduktionswege, die für die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren möglicherweise eine Rolle spielen [Sliwkowski et al. 1999, Allred und Swanson 2000].
- Ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung bei einer hohen Überexpression, die zu einer verstärkten Zellproliferation führt [Pegram und Slamon 2000].

---

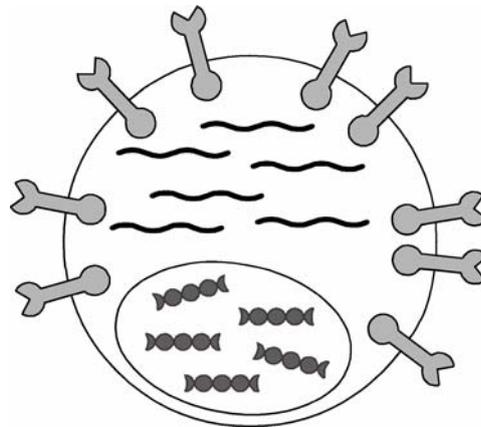
**HER-2/neu-Status: Genamplifikation und Proteinüberexpression**

---

(A)



(B)



---

**Abbildung 1. HER-2/neu-Status:** (A) In einer normalen Epithelzelle mit diploidem Chromosomensatz liegt das HER-2/neu-Gen in zweifacher Kopie vor. Auf der Zelloberfläche finden sich nur sehr wenige Rezeptoren. (B) Eine HER-2/neu-positive Tumorzelle hingegen exprimiert 10 bis 100 mal mehr HER-2/neu-Rezeptoren auf ihrer Plasmamembran. In der Regel liegt dieser Proteinüberexpression eine Amplifikation des Gens zugrunde.

#### 1.4.4 Prognostische und prädiktive Relevanz

Über die prognostische Bedeutung des HER-2/neu-Onkogens wurde erstmals 1987 berichtet [Slamon et al. 1987]. Ein positiver HER-2/neu-Status weist auf einen aggressiveren, rascher metastasierenden Phänotyp und damit eine schlechtere Prognose der Mammakarzinomerkrankung hin. Dies drückt sich in einem verkürzten rezidivfreien Überleben sowie einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit aus [Slamon et al. 1987, Slamon et al. 1989a, Gusterson et al. 1992, Toikkanen et al. 1992, Seshadri et al. 1993, Hynes und Stern 1994, Press et al. 1997, Revillion et al. 1998]. Eine Amplifikation beziehungsweise Überexpression ist häufiger bei axillärem Lymphknotenbefall, hoher Proliferationsrate, negativem Östrogenrezeptorstatus sowie hohem Grading des Primärtumors [Kallioniemi et al. 1991, Lovekin et al. 1991, McCann et al. 1991, Rilke et al. 1991, Winstanley et al. 1991]. Ob ein positiver HER-2/neu-Status auch unabhängig von anderen Prognosefaktoren prognostische Relevanz besitzt, ist allerdings noch nicht endgültig geklärt [Revillion et al. 1998, Jacobs et al. 1999].

Die teilweise widersprüchlichen Angaben zum Stellenwert von HER-2/neu als Prognosefaktor beim nodal-negativen Mammakarzinom sind vermutlich größtenteils auf technische und methodische Unterschiede in der Bestimmung des HER-2/neu-Status zurückzuführen [Slamon et al. 1989b, Bianci et al. 1993, Press et al. 1994b].

Auch in anderen malignen Tumoren wie dem Ovarial- [Berchuck et al. 1990, Meden und Kuhn 1997], Pulmonal- [Kern et al. 1990], Endometrium- [Hetzl et al. 1992, Saffari et al. 1995], Speicheldrüsen- [Press et al. 1994a] und Magenkarzinom [Ranzani et al. 1990] können HER-2/neu-Genamplifikationen beziehungsweise Proteinüberexpressionen nachgewiesen werden. Hier bedeutet dies ebenfalls eine schlechtere Prognose bezüglich des rezidivfreien sowie des Gesamtüberlebens.

Eine prädiktive Bedeutung hat ein positiver HER-2/neu-Status beim metastasierten Mammakarzinom in Bezug auf das Ansprechen einer Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Herceptin® (siehe 1.4.5) [Allred et al. 1998, Pegram et al. 1998, Ross und Fletcher 1998, Slamon et al. 2001]. Wesentlich unklarer ist der Einfluss

einer HER-2/neu-Überexpression auf die Resistenz oder Sensitivität gegenüber einer Chemo- oder Hormontherapie [Konecny et al. 2000].

#### 1.4.5 Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab (Handelsname: Herceptin®; Roche Ltd., Basel, Schweiz / Genentech Inc., South San Francisco, USA) ist ein rekombinanter, humanisierter, monoklonaler Anti-HER-2/neu-Antikörper vom IgG1-kappa-Typ, der gentechnisch aus einem spezifischen Mausantikörper und einem unspezifischen menschlichen IgG hergestellt wird [Shepard et al. 1991, Carter et al. 1992].

Anders als übliche Chemotherapien reagiert Herceptin® spezifisch mit HER-2/neu-positiven Tumorzellen; es bindet mit hoher Affinität an die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors [Shak 1999]. Durch diesen Mechanismus wird die Proliferation HER-2/neu überexprimierender Tumorzellen sowohl in vitro als auch in vivo gestoppt [Hudziak et al. 1989, Lewis et al. 1993, Baselga et al. 1998]. Herceptin® ist kein klassisches Zellgift. Auch nichtproliferierende Tumorzellen werden von der Therapie erfasst, wenn sie das HER-2/neu-Protein überexprimieren. Die Wachstumshemmung ist multifaktoriell: so spielen die Blockade des HER-2/neu-Signaltransduktionsweges, die Aktivierung der zellulären Zytotoxizität und eine ausgeprägte Angiogenesehemmung eine bedeutende Rolle [Slamon et al. 1987, Shepard et al. 1991, Pegram et al. 1997, Izumi et al. 2002].

In den USA ist Trastuzumab seit Herbst 1998 von der FDA (Food and Drug Administration, USA) und in der EU seit Sommer 2000 zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass Herceptin® bei Tumoren mit positivem HER-2/neu-Status ein wirksames adjuvantes Therapeutikum ist [Baselga et al. 1998, Shak 1999], dessen Einsatz zur Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um durchschnittlich etwa 3 Monate sowie des Gesamtüberlebens um durchschnittlich etwa 5 Monate führt [Slamon et al. 2001].

### 1.4.6 Diagnostische Methoden

Die Bestimmung einer HER-2/neu-Genamplifikation beziehungsweise Proteinüberexpression im Tumorgewebe kann mittels folgender Methoden durchgeführt werden [Ross und Fletcher 1998, Jacobs et al. 1999]:

1. Bestimmung einer Genamplifikation
  - Southern-Blot
  - Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
  - Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
2. Bestimmung einer Proteinüberexpression
  - Western-Blot
  - ELISA
  - Immunhistochemie (IHC)

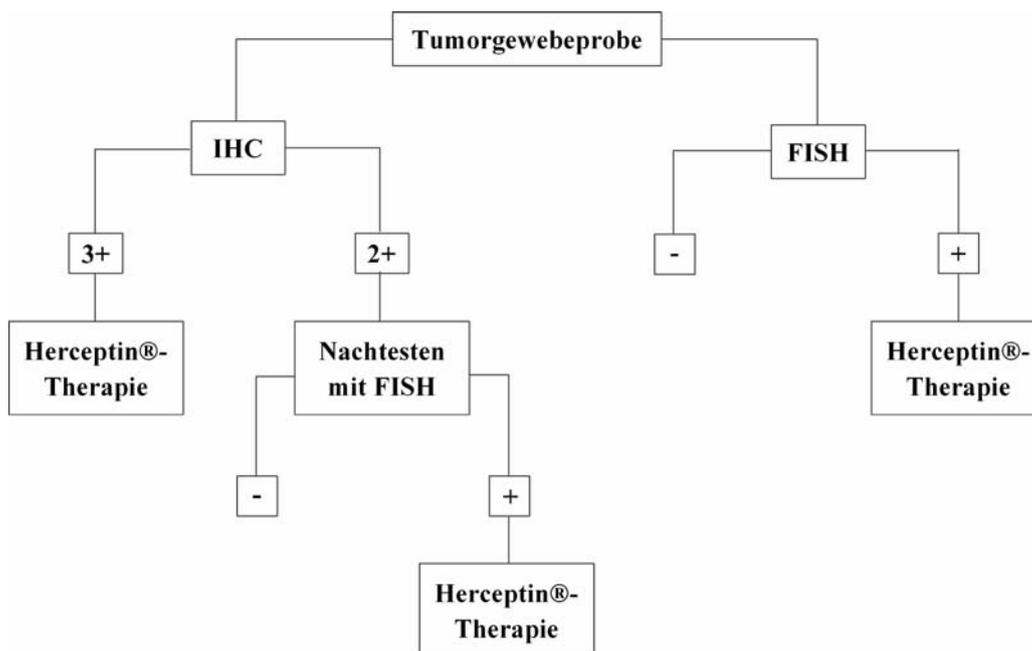
Die Blotting-Verfahren weisen den Nachteil auf, dass sie durch das Verhältnis Tumor- zu Stromakomponente in der untersuchten Probe und der daraus resultierenden Probenverunreinigung durch normale Stroma-DNA beeinflusst werden [Ross und Fletcher 1999, Pauletti et al. 2000]. Zudem erfordern sie mehr Gewebe und Frischmaterial als andere Tests [Hoang et al. 2000]. Daher sind die IHC (siehe 2.2.3) und die FISH (siehe 2.2.2) sowohl am Paraffin- als auch am Gefrierschnitt gegenwärtig von größerer Bedeutung [McCormick et al. 2002]. Sie ermöglichen die Erhebung des HER-2/neu-Status für individuelle Zellen oder Zellpopulationen bei gleichzeitiger Erhaltung der Gewebearchitektur [Pauletti et al. 2000].

Voraussetzung für eine erfolgreiche Antikörpertherapie mit Trastuzumab ist eine zuverlässige Bestimmung des HER-2/neu-Status. In der Regel geschieht dies immunhistochemisch mit einem standardisierten Test. Festgelegt wurde ein IHC-Score (siehe 2.2.4.3) von 0 (nicht exprimiert) bis 3+ (stark überexprimiert). HER-2/neu 3+-positive Patientinnen profitieren am meisten von der Herceptin®-Therapie. Zudem zeigen Patientinnen mit 2+-positiven Tumoren bei gleichzeitig bestehender HER-2/neu-Genamplifikation die gleiche klinische Ansprechrate wie Patientinnen, deren Karzinom

in der IHC stark positiv (3+) reagiert [Kallioniemi et al. 1992, Schaller et al. 1999, Mass et al. 2000, Schaller und Untch 2002]. Daher wird mittlerweile allgemein international empfohlen, Patientinnen mit einem IHC-Score von 3+ als geeignet für eine Herceptin®-Therapie zu betrachten und darüber hinaus Patientinnen mit einem IHC-Score von 2+ mit FISH nachzutesten, wobei bei den FISH-positiven Fällen ebenfalls eine Herceptin®-Therapie indiziert ist (Abb. 2) [Ellis et al. 2000, Hoang et al. 2000, Jimenez et al. 2000, Mass et al. 2000, Wang et al. 2000, Lebeau et al. 2001, Tubbs et al. 2001, Perez et al. 2002].

### HER-2/neu-Testalgorithmus

---



**Abbildung 2.** HER-2/neu-Testalgorithmus zur Identifizierung der für eine Herceptin®-Therapie geeigneten Patientinnen.

## 1.5 Fragestellung

Das derzeit international empfohlene Routinevorgehen zur Bestimmung des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomen besteht primär in der Untersuchung der Proteinrezeptorexpression mittels IHC an Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben. Bei einem immunhistochemischen Score von 0, 1+ oder 3+ kann eine Therapieentscheidung auch ohne Kenntnis des HER-2/neu-Genstatus getroffen werden. Bei einem Score von 2+ hingegen sollte eine Nachtestung mittels FISH erfolgen, wobei bei den FISH-positiven Fällen wie bei einem Score von 3+ eine Herceptin®-Therapie indiziert ist.

In der Routine wird die FISH-Färbung wie die IHC hauptsächlich am Paraffinschnitt durchgeführt. Die Untersuchung ist allerdings auch an zytologischen Tumorabklatschpräparaten möglich, die durch geringeren Aufwand und Zeiteffizienz in der Präparatherstellung und -färbung sowie durch die Möglichkeit der Beurteilung ganzer Zellkerne Vorteile aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit soll der HER-2/neu-Status an Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomzellen mittels FISH bestimmt und mit der immunhistochemischen, membranassoziierten Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins von Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben verglichen werden.

Die Fragestellungen lauten:

1. Ist die FISH an Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen durchführbar?
2. Was sind die Vor- und Nachteile von Tumorabklatschpräparaten?
3. Sind die Ergebnisse der FISH-Färbung an Tumorabklatschpräparaten mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten vergleichbar?
4. Was sind die Vor- und Nachteile beider Methoden?
5. Wie ist die klinisch-pathologische Relevanz beider Methoden zu beurteilen?

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Mammakarzinomgewebe**

Untersucht wurden 150 Mammakarzinome von Patientinnen, die an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zwischen November 1999 und Februar 2002 operiert wurden. Einziges Auswahlkriterium war die Diagnose eines histologisch gesicherten, invasiven Mammakarzinoms. Dabei handelte es sich in 89 (59,3%) Fällen um ein duktales, in 28 (18,7%) um ein lobuläres, in 20 (13,3%) um ein duktulo-lobuläres, in 2 (1,3%) um ein klarzelliges, in 5 (3,3%) um ein medulläres, in 3 (2,0%) um ein muzinöses sowie in 3 (2,0%) um ein gemischtes duktales und lobuläres Karzinom. Das Grading (nach Bloom und Richardson 1957) wurde durch den Pathologen 3 mal (2,0%) als G1, 102 mal (68,0%) als G2 und 41 mal (27,3%) als G3 eingestuft. In 4 (2,7%) Fällen lag keine Angabe vor, da bei Rezidiven kein Grading und Staging durchgeführt wurde. Das Alter der Patientinnen lag zum Operationszeitpunkt zwischen 27 und 80 Jahren bei einem Median von 58 Jahren. Diese Daten sowie Angaben zum Tumorstaging, zum Östrogenrezeptor- und zum Progesteronrezeptorstatus (*Tab. 1*) wurden aus der Routinediagnostik der Universitäts-Frauenklinik Tübingen übernommen. Ihre Bestimmung erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universität Tübingen.

**Tabelle 1. Patientinnenalter und histopathologische Merkmale der untersuchten Mammakarzinomgewebe**

	Anzahl	%
Patientinnen insgesamt	150	100,0
<b>Alter</b>		
≤ 35	8	5,3
36-50	43	28,7
51-54	15	10,0
≥ 55	84	56,0
Median	58	
<b>Histologie</b>		
duktal	89	59,4
lobulär	27	18,0
duktulo-lobulär	21	14,0
klarzellig	2	1,3
medullär	5	3,3
muzinös	3	2,0
gemischt duktal / muzinös	3	2,0
<b>Grading</b>		
G1	3	2,0
G2	102	68,0
G3	41	27,3
Rezidiv <sup>1</sup>	4	2,7
<b>Staging (UICC<sup>2</sup> 1997)</b>		
pT1	75	50,0
pT2	59	39,3
pT3	8	5,3
pT4	4	2,7
pN0	77	51,3
pN1a	3	2,0
pN1b	59	39,3
pN2	3	2,0
pNx <sup>3</sup>	4	2,7
Rezidiv <sup>1</sup>	4	2,7
<b>Hormonrezeptorstatus</b>		
ER positiv	121	80,7
ER negativ	29	19,3
PR positiv	106	70,7
PR negativ	44	29,3

<sup>1</sup>Bei Rezidiven wurde kein Grading und Staging durchgeführt.

<sup>2</sup>UICC: Internationale Gemeinschaft gegen den Krebs.

<sup>3</sup>pNx: Axilläre Lymphknoten konnten nicht beurteilt werden.

**2.1.2. Kit**

PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit für 50 Tests	Vysis Inc., Downers Grove, USA
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. LSI HER-2/neu SpectrumOrange (low copy number E. coli Vektor) / CEP17 SpectrumGreen DNA-Sonde (E. coli Plasmid), 500 µl</li> <li>2. DAPI-Gegenfärbung (1000ng/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindol in Phenylendiamindihydrochlorid, Glycerin und Puffer), 600 µl</li> <li>3. NP-40, 4 ml</li> <li>4. 20x SSC-Salz, 66 g</li> </ol>	

**2.1.3 Chemikalien**

Ethanol 99,9%	Merck, Darmstadt
Wasser, destilliert (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

**2.1.4 Lösungen**

20x SSC, 250 ml (3M Natriumchlorid, 0,3M Natriumcitrat, pH 5.3)	20x SSC-Salz, 66 g destilliertes Wasser
2x SSC/0,1% NP-40, 500 ml	20x SSC (pH 5,3), 50 ml destilliertes Wasser, 450 ml NP-40, 500 µl
0,5x SSC/0,1% NP-40, 500 ml	20x SSC (pH 5,3), 12,5 ml destilliertes Wasser, 487,5 ml NP-40, 500 µl

70%iges Ethanol, 250 ml	99,9%iges Ethanol, 175 ml destilliertes Wasser, 75 ml
80%iges Ethanol, 250 ml	99,9%iges Ethanol, 212,5 ml destilliertes Wasser, 37,5 ml

### 2.1.5 Geräte

Denaturierungs-/Hybridisierungssystem (HyBrite™)	Vysis Inc., Downers Grove, USA
Einfachbandpassfilter (Orange, Green und DAPI)	Vysis Inc., Downers Grove, USA
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Hardware (Power Macintosh G3)	Apple Computer Inc., Cork, Irland
Kamera (Typ FK 7512/Q)	Pierer GmbH, Düsseldorf
Mikrozentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus, Osterode
Pipetten, verschiedene Volumina (Reference®)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetus®-akku)	Hirschmann, Eberstadt
Quecksilberdampfampe, 100 Watt (Typ USH-102D)	Ushio Inc., Tokio, Japan
Software (Quips® PathVysion, SmartCapture VP, Version 1.4)	Vysis Inc., Downers Grove, USA
Vortex-Mixer	Cenco, Breda, Niederlande
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

**2.1.6 Verbrauchsmaterial**

Deckgläser, verschiedene Größen	Langenbrinck, Teningen
Fixationsspray (Merckofix®)	Merck, Darmstadt
Foto-Klebstoff	Herma, Filderstadt
Handschuhe (Safeskin satin plus)	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Immersionsöl für Fluoreszenzmikroskopie	Olympus, Hamburg
Messpipetten (20 ml)	Hirschmann, Eberstadt
Objektträger, silanisiert (Superfrost®)	Langenbrinck, Teningen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

Alufolie
Nagellack

**2.1.7 Sonstiges**

Diamantschreiber	Roth, Karlsruhe
Färbeküvetten	Langenbrinck, Teningen
Laborthermometer, geeicht	Roth, Karlsruhe
Laborwecker	Roth, Karlsruhe
Messzylinder, verschiedene Volumina	Hirschmann, Eberstadt
Pinzette	Roth, Karlsruhe

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tumorabklatschpräparate**

Als Untersuchungsmaterial dienten Mammakarzinomgewebe, die im Rahmen von Probeexzisionen, Tumorektomien und Quadrantenresektionen bei brusterhaltender Therapie oder im Rahmen von Mastektomien gewonnen wurden.

Die Herstellung der Tumorabklatschpräparate erfolgte durch das histopathologische Labor des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen. Dazu wurde eine frische Schnittfläche des operativ entnommenen Tumorgewebes fünf- bis zehnmal leicht auf verschiedene Stellen eines silanisierten Objektträgers gedrückt, wobei von einem Tumor mindestens drei Präparate angefertigt wurden. Die Fixierung erfolgte mit zytologischem Fixationsspray. Anschließend wurden die Präparate an der Luft getrocknet und bis zur Färbung mittels FISH bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

#### **2.2.2.1 Grundlagen**

Die ersten Publikationen zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erschienen Mitte bis Ende der 80er Jahre [Cremer et al. 1986, Pinkel et al. 1986, Lichter et al. 1988, Pinkel et al. 1988]. Diese Methode stellt eine Verbindung von klassischer Chromosomenanalyse und molekularen Methoden dar [Passarge 2001]. Sie dient unter anderem zum Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen in Metaphase- und Interphasekernen, zur Detektion von Genamplifikationen, Deletionen und Translokationen und zur Lokalisation viraler Integrationsorte [Hyytinen et al. 1994]. Ferner wird die FISH zur Genkartierung und zur Analyse der Nukleusorganisation eingesetzt [Hanke et al. 1997].

FISH-Untersuchungen können an Zellsuspensionen, die auf Objektträgern fixiert sind, an Paraffinschnitten und an Gefrierschnitten durchgeführt werden [Pasternak 1997].

Die Technik beruht auf der Fähigkeit einsträngiger DNA, sich mit komplementären Basensequenzen zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammenzulagern (Hybridisierung). Die native Doppelstrangstruktur der Kern-DNA wird unter geeigneten Bedingungen (thermisch bei 70-95°C) zerstört (Denaturierung), die entstehenden Einzelstränge werden anschließend mit einer einsträngigen DNA-Sonde (etwa 500 Basenpaare umfassende Genfragmente) hybridisiert (*Abb. 3*). Die Hybridisierung findet punktuell an der Stelle statt, wo Sonde und DNA des Präparats komplementär sind, nicht jedoch in allen anderen Bereichen [Gray und Pinkel 1992, Hanke et al. 1997, Passarge 2001, Petrides 2003].

Zum Auffinden des Hybridisierungsorts auf dem Chromosom muss die DNA-Sonde direkt oder indirekt markiert sein. Sie kann mit fluoreszierenden Molekülen direkt gekoppelt werden, was in der Regel durch den Einbau markierter Nukleotide geschieht. Bei der indirekten Markierung wird die Sonde durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht, wobei die dabei bindenden Antikörper die zur Detektion notwendigen Fluoreszenzfarbstoffe tragen.

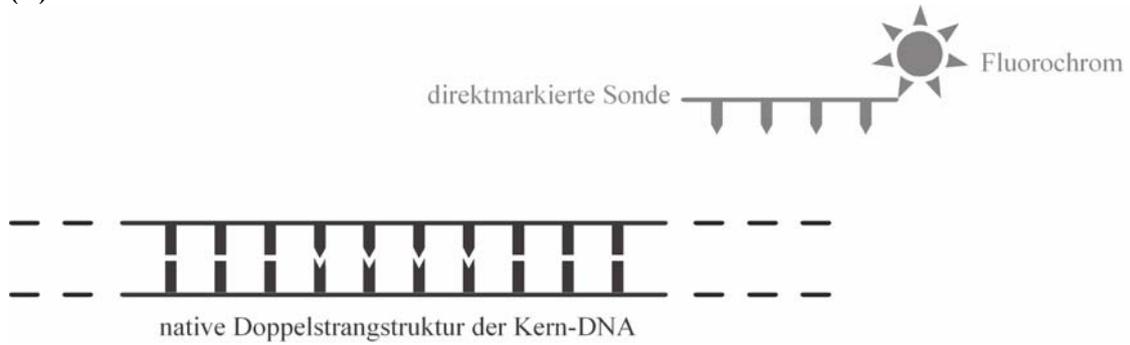
Die Verfügbarkeit verschiedener Fluorochrome, die farbdifferente Signale geben, ermöglicht die gleichzeitige Verwendung multipler Sonden (Sondenmischung). Dadurch sind in einer einzelnen Zelle verschiedene DNA-Abschnitte auf Chromosomen darstellbar. Die Analyse der Hybridisierungssignale erfolgt fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe und speziellen Exzitationsfiltern [Hanke et al. 1997, Pasternak 1997].

---

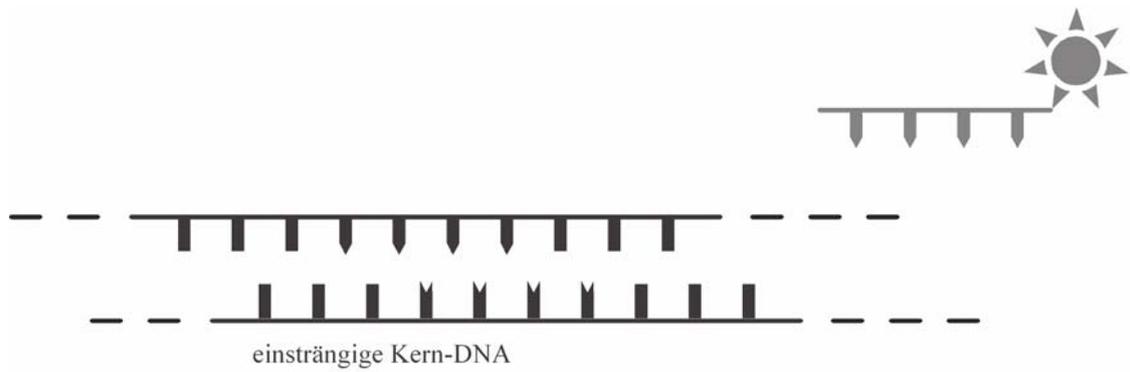
**Prinzip der FISH-Technik**

---

(A)



(B)



(C)



---

**Abbildung 3. Prinzip der FISH-Technik. (A) Die Kern-DNA und die mit einem Fluorochrom direktmarkierte Sonde werden zusammen unter geeigneten Bedingungen inkubiert. (B) Denaturierung: Die native Doppelstrangstruktur der Kern-DNA wird zerstört. (C) Hybridisierung: Die Sonde bindet an den komplementären Abschnitt der einsträngigen Kern-DNA.**

### 2.2.2.2 HER-2/neu DNA Sonden-Kit

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete standardisierte PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit der Firma Vysis wurde von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zur Untersuchung des HER-2/neu-Genstatus bei Mammakarzinomen freigegeben. Es basiert auf der Dual-color-FISH-Technik mit zwei verschiedenfarbig markierten Sonden zur Detektion zweier Chromosomenabschnitte. Dies ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung der HER-2/neu-Genkopien und der Anzahl des Chromosoms 17 durch Auszählen der fluoreszierenden Sondersignale.

Die LSI HER-2/neu DNA-Sonde ist eine 190 kb große, mit dem Fluorochrom SpectrumOrange direktmarkierte spezifische DNA-Sonde für den Genlocus von HER-2/neu auf dem Chromosom 17 (17q11.2-q12). Die 5,4 kb große, mit dem Fluorochrom SpectrumGreen direktmarkierte CEP17-Sonde bindet spezifisch an die alpha-Satelliten-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1). Die Darstellung des Chromosoms 17 ermöglicht die Erkennung einer Chromosom 17-Aneuploidie und damit die Differenzierung zwischen einer tatsächlichen Genamplifikation und vermehrten HER-2/neu-Genkopien aufgrund einer erhöhten Anzahl des Chromosoms 17 (Chromosom 17-Polyploidie).

Die Sondenmischung des Färbekits enthält zusätzlich blockierende DNA und ist zur einfacheren Handhabung und damit schnelleren Diagnostik in Hybridisierungspuffer vorgemischt und vordenaturiert.

### 2.2.2.3. Durchführung

Die Färbeschritte erfolgten in Anlehnung an die dem Sonden-Kit beigegefügte Anleitung. Nach Rücksprache mit der Firma Vysis wurden verschiedene Abänderungen vorgenommen, um das auf Paraffinschnitte ausgerichtete Färbeprotokoll an zytologische Abklatschpräparate anzupassen.

## Tag 1

Waschvorgang zur Vorbehandlung

1. In einer Färbeküvette den Waschpuffer 2x SSC/0,1% NP-40 im Wasserbad auf 37°C erwärmen.
2. Mit einem Diamantschreiber die zu hybridisierende Fläche auf der Objektträgerunterseite markieren. Diese sollte möglichst gleichmäßig mit abgeklasteten Zellen bedeckt sein.
3. Nach Temperaturkontrolle die Objektträger 20-30 Minuten lang in den auf 37°C erwärmten Puffer tauchen. Nicht mehr als 5 Objektträger auf einmal in eine Färbeküvette geben.

Entwässerung

4. Die Objektträger aus der Waschlösung nehmen und direkt für 2 Minuten in eine 70%ige Ethanollösung bei Raumtemperatur setzen.
5. Überschüssiges Ethanol anschließend durch Aufsetzen der Objektträgerunterkanten auf ein saugfähiges Papiertuch entfernen.
6. Die Schritte 4 und 5 mit 85%igem Ethanol, dann mit 99,9%igem Ethanol wiederholen.
7. Die Objektträgerunterseiten mit einem Papiertuch trockenwischen.
8. Im HYBrite™ die Objektträger bei 45°C 2-5 Minuten lang trocknen.  
Das HYBrite™-System der Firma Vysis ermöglicht das Trocknen, Denaturieren und Hybridisieren von Präparaten im Dunkeln bei individuell festlegbarer konstanter Zeit und Temperatur.

Vorbereitung der Sondenmischung (Komponenten der Sondenmischung siehe 2.2.1)

9. Die Sondenmischung (während des Waschvorgangs und der Entwässerung) auf Raumtemperatur anwärmen lassen, so dass die Viskosität abnimmt und genaueres Pipettieren möglich ist.

10. Auf einem Vortex-Mixer die Sonde durchmischen. Anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um den Inhalt auf den Boden des Sondenröhrchens zu bringen.

#### Denaturierung und Hybridisierung

11. Je 10 µl der Sondenmischung auf Deckgläser (22mmx22mm) pipettieren.
12. Ein Deckglas auf die zu hybridisierende Fläche jedes Objektträgers so aufbringen, dass sich die Sondenlösung gleichmäßig ausbreitet. Luftblasen müssen vermieden werden, da sie die Hybridisierung verhindern.
13. Die Deckgläser mit Foto-Klebstoff umranden. Dieser sollte sowohl den Deckglasrand als auch den umliegenden Bereich des Objektträgers überdecken und somit das Deckglas abdichten.
14. Die Objektträger in den auf Denaturierung und Hybridisierung programmierten HYBrite™ einlegen und das Programm starten:
  - Denaturierung: 5 Minuten bei 73°C,
  - Hybridisierung: >16 Stunden bei 37°C (über Nacht).

#### Tag 2

#### Waschvorgang nach Hybridisierung

15. In einer Färbeküvette die Waschlösung 0,5x SSC/0,1% NP-40 im Wasserbad auf 72±1°C erhitzen.
16. Den Puffer 2x SSC/0,1% NP-40 in eine zweite Färbeküvette geben (Raumtemperatur) und diese zum Schutz der Fluoreszenz mit Alufolie umwickeln.
17. Die Objektträger aus dem HYBrite™ nehmen und den Foto-Klebstoff mit einer Pinzette vorsichtig abziehen.
18. Die Objektträger 5 Minuten lang in den raumtemperierten Puffer geben, damit sich die Deckgläser lösen.

19. Noch haftende Deckgläser vorsichtig mit einer Pinzette abnehmen. Übermäßige Flüssigkeit durch Aufsetzen der Objektträgerkanten auf ein saugfähiges Papiertuch entfernen.
20. Nach Temperaturkontrolle die Objektträger 2 Minuten lang in die auf  $72\pm 1^\circ\text{C}$  erhitzte Waschlösung tauchen.
21. Die Objektträger bei Raumtemperatur 2 Minuten lang erneut in den Puffer 2x SSC/0,1% NP-40 geben und anschließend wieder überschüssige Flüssigkeit mit einem Papiertuch aufsaugen.
22. Die Objektträger an der Luft im Dunkeln trocknen lassen.
23. Je 10  $\mu\text{l}$  der DAPI-Gegenfärbung (Darstellung der Zellkerne) auf die Deckgläser (24mmx32mm) pipettieren.
24. Ein Deckglas auf den zu untersuchenden Bereich jedes Objektträgers aufbringen. Die DAPI-Gegenfärbung sollte sich ohne Luftblasen möglichst gleichmäßig verteilen.
25. Die Deckglasränder mit Nagellack versiegeln.

#### Aufbewahrung der Präparate

26. Hybridisierte Objektträger bis zur Auswertung beziehungsweise zum Archivieren im Dunkeln bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahren.
27. Vor der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop die Objektträger auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

#### 2.2.2.4 Auswertung

Die Durchführung und Auswertung der FISH-Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau cand. med. Regine Arnold, so dass alle Präparate jeweils von zwei Untersuchern beurteilt wurden. Strittige Fälle wurden gemeinsam mit einem in der FISH-Auswertung routinierten Pathologen besprochen.

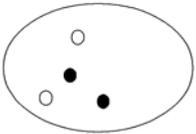
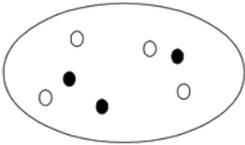
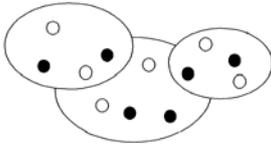
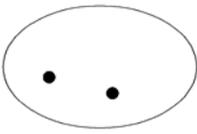
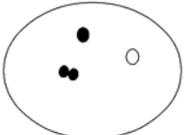
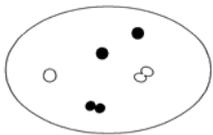
### Fluoreszenzmikroskopie

Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop Typ BX60 der Firma Olympus unter Verwendung einer 100 Watt-Quecksilberdampfampe und geeigneten Einfachbandpassfiltern zur Detektion des HER-2/neu-Sondensignals (SpectrumOrange), des CEP17-Sondensignals (SpectrumGreen) sowie der DAPI-Gegenfärbung (blau fluoreszierender Farbstoff zur Kernfärbung). Bei 10facher beziehungsweise 40facher Vergrößerung wurden auf den angefärbten Tumorabklatschpräparaten zellreiche Areale mit dem DAPI-Filter aufgesucht; die Signalauswertung erfolgte bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl.

### Auswertkriterien

Gezählt wurden in jedem Präparat sowohl die HER-2/neu- als auch die CEP17-Signale in 60 morphologisch intakten, nicht überlappenden Tumorzellkernen durch mäanderförmiges Abfahren des Objektträgers. Eventuell ebenfalls im Präparat enthaltene Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten/Fibrozyten und epitheliale Zellen wurden anhand ihrer Kernmorphologie von der Auswertung ausgeschlossen. Tumorzellkerne mit nicht eindeutig feststellbaren Grenzen, mit Signalen von geringer Intensität oder mit stark fluoreszierendem Hintergrund wurden nicht gezählt. Ebenfalls erfolgte keine Auswertung von Zellkernen ohne Signal oder mit Signalen von nur einer Farbe. Eine Zelle wurde also nur berücksichtigt, wenn mindestens ein deutliches HER-2/neu- und ein deutliches CEP17-Signal innerhalb klar erkennbarer Kerngrenzen vorhanden waren. Zwei Signale gleicher Größe mit einem Abstand kleiner oder gleich des Durchmessers der Einzelsignale wurden als ein Signal (gesplittetes Signal) gewertet (*Abb. 4*). Um auf verschiedenen Färbeebenen liegende Signale zu erfassen, war ein ständiges Durchfokussieren der Tumorzellkerne erforderlich.

## Beispiele und Richtlinien zum Auszählen der HER-2/neu-Sondensignale

	2 HER-2/neu-Signale und 2 CEP17-Signale.
	3 HER-2/neu-Signale und 4 CEP17-Signale.
	Keine Auswertung. Die Zellkerne sind überlappend. Einige Signale können nicht eindeutig zugeordnet werden.
	Keine Auswertung. Der Zellkern enthält nur HER-2/neu-Signale und keine CEP17-Signale.
	2 HER-2/neu-Signale und 1 CEP17-Signal. Ein HER-2/neu-Signal ist gesplittet.
	2 HER-2/neu-Signale und 3 CEP17-Signale. Ein HER-2/neu-Signal und ein CEP17-Signal sind gesplittet.

**Abbildung 4.** Beispiele und Richtlinien zum Auszählen der Signale in Anlehnung an die Empfehlungen der Firma Vysis.

● = HER-2/neu-Sondenignal, ○ = CEP17-Sondenignal.

### HER-2/CEP17-Ratio

Für jeden Tumorzellkern wurde ein Zahlenpaar bestehend aus der Signalanzahl für das HER-2/neu-Gen und für das Chromosom 17-Zentromer ermittelt und in eine Auswertungstabelle (Tab. 2) eingetragen. Die Ermittlung der HER-2/CEP17-Ratio erfolgte aus dem Signalverhältnis von HER-2/neu zu CEP17 aus 60 gezählten Tumorzellkernen, indem die Gesamtzahl der HER-2/neu-Signale durch die Gesamtzahl der Chromosom 17-Signale geteilt wurde. Wie im Protokoll des Sonden-Kits der Firma Vysis vorgegeben, lag eine HER-2/neu-Genamplifikation bei einer Ratio  $\geq 2,0$  vor, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,2 Grenzwerte darstellten und mit Vorsicht zu

interpretieren waren. Die Ratio ermöglicht die Differenzierung zwischen einer tatsächlichen Genamplifikation und vermehrten HER-2/neu-Signalen aufgrund einer erhöhten Zahl des Chromosoms 17 (Chromosom 17-Polyploidie).

#### Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl

Bei anderen HER-2/neu-Testsystemen (zum Beispiel Inform™ HER-2/neu Gene Detection System; Ventana Medical Systems/Oncor Inc., Tucson/Gaithersburg, USA) wird nur die Anzahl der HER-2/neu-Sondensignale pro Tumorzellkern bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern für jedes Mammakarzinom durch Division der Gesamtzahl der HER-2/neu-Signale durch 60 (Zahl der gewerteten Tumorzellkerne pro Tumorabklatschpräparat) berechnet. Ein Ergebnis von durchschnittlich  $> 4$  bis  $\leq 10$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern wurde als „low level“-Amplifikation und von durchschnittlich  $> 10$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern als „high level“-Amplifikation gewertet.

**Tabelle 2. Auswertung der Fluoreszenzsignale**

HER-2/neu <sup>1</sup>	CEP17 <sup>2</sup>											TOTAL
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11-15												
16-20												
21-30												
31-40												
41-60												
61+												
TOTAL												

<sup>1</sup>HER-2/neu: Anzahl der HER-2/neu-Sondensignale im ausgezählten Tumorzellkern.

<sup>2</sup>CEP17: Anzahl der Chromosom 17-Sondensignale im ausgezählten Tumorzellkern.

### Dokumentation

Eine exemplarische Dokumentation charakteristischer Tumorzellkerne erfolgte für jedes Präparat digital per Computer mit der Software Quips® PathVysion der Firma Vysis. Dabei wurden die Bilder der drei verschiedenen Filter für DAPI, SpectrumOrange beziehungsweise SpectrumGreen mit einer geeigneten Kamera einzeln aufgenommen und anschließend digital zu einem Bild zusammengeführt.

## **2.2.3 Immunhistochemie**

### 2.2.3.1 Grundlagen

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine (Antigene) in Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierbei binden sogenannte Primärantikörper mit ihrem F(ab)-Fragment an Proteine, die sich beispielsweise auf der Zellmembran oder im Zytoplasma befinden. Diese Primärantikörper können je nach Herstellungsart monoklonal und damit gegen ein bestimmtes Epitop eines Proteins oder polyklonal und damit gegen verschiedene Proteinepitope gerichtet sein. Verunreinigungen in Form von Antikörpern gegen andere Proteine können sogenannte unspezifische Signale bedingen und falsch positive Ergebnisse vortäuschen.

An Formalin-fixierten Geweben ist oftmals eine Antigendemaskierung nötig. Durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen und dem Formalin kommt es zu einer Proteindenaturierung mit sterischen Konformationsänderungen wie beispielsweise einer Proteinentfaltung. Dadurch sind die Zielproteinepitope der Antikörper verdeckt und können nicht erkannt werden. Die Antigendemaskierung renaturiert die Proteine meist über eine thermische Vorbehandlung im Pufferbad und legt so die maskierten Epitope wieder frei.

Um den an das gesuchte Protein gebundenen mono- oder polyklonalen Antikörper darzustellen, wird ein sogenannter Sekundärantikörper auf das Schnittpräparat

aufgebracht, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das einen zugegebenen Farbstoff chemisch umsetzt und so den Ort lichtmikroskopisch sichtbar macht, an dem sich das gesuchte Protein befindet [Löffler und Wiederanders 2003].

Die im Routinebetrieb des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen angewandte Avidin-Biotin-Komplex- (ABC-) Methode [nach Hsu et al. 1981] zur Detektion des Primärantikörpers ist eine signalverstärkende und damit die Sensitivität der Untersuchung erhöhende Methode. Sie nutzt die starke Affinität zwischen Avidin und Biotin. An den Primärantikörper bindet ein Sekundär- (oder Brücken-) Antikörper, an dessen Fc-Fragment Biotin kovalent gebunden ist. Ein anschließend aufgetragener Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex reagiert wiederum mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers (*Abb. 5*). Nach Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) wird dieser durch die Peroxidase zu einem braunen Niederschlag im Bereich des Enzymkomplexes umgesetzt, der lichtmikroskopisch sichtbar ist.

#### Avidin-Biotin-Komplex-Methode

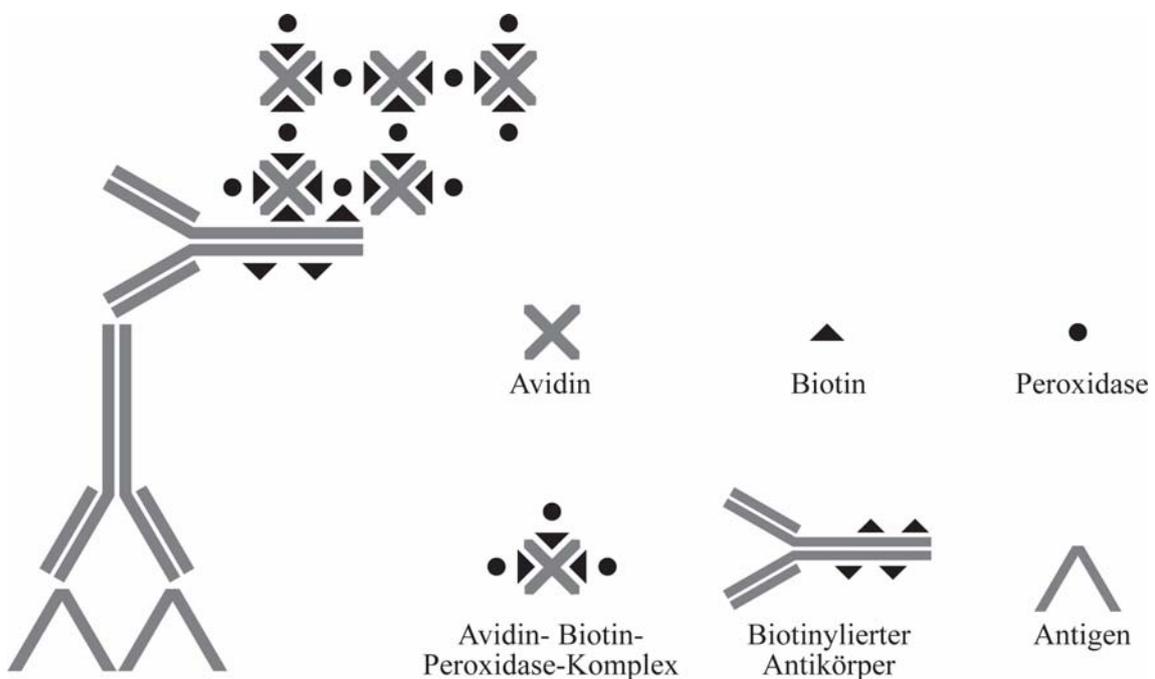


Abbildung 5. Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

### 2.2.3.2 Paraffinschnitte

Die Herstellung der Paraffinschnitte war nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit und erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universität Tübingen. Dazu wurden die für die immunhistochemische Färbung bestimmten Mammakarzinomgewebeproben in phosphatgepuffertem 4%igem Formalin (pH 7,2) über 24 Stunden fixiert, maschinell über einer aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und danach mit Xylol als Intermedium sowie Paraffin infiltriert. Im Anschluss daran wurde das Gewebe in kleine Paraffinblöcke gegossen, von denen sich nach Abkühlen und Erstarren des Paraffins mit einem Schlittenmikrotom bei etwa  $-10$  bis  $0^{\circ}\text{C}$  Schnitte mit einer Dicke von  $4\ \mu\text{m}$  anfertigen ließen. Diese wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Die Antrocknung der Paraffinschnitte erfolgte über Nacht im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3.3 Antikörper

Zum Nachweis des HER-2/neu-Rezeptorproteins wurden der monoklonale Antikörper CB11 der Firma Novocastra (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, England) und der polyklonale Kaninchen Anti-human c-erbB-2 Onkoprotein-Antikörper der Firma Dako (Dako, Hamburg) verwendet. Beide Antikörper binden an die intrazelluläre Domäne des transmembranen HER-2/neu-Rezeptors und wurden mit der ABC-Methode (Vectastain® Universal Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, USA) detektiert (*Tab. 3*), die im immunhistochemischen Labor des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen im Routinebetrieb angewandt wird.

### 2.2.3.4 Auswertung

Die immunhistochemischen Scores wurden aus den Routinebefunden des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen übernommen.

Die Auswertung der Präparate durch den Pathologen erfolgte semiquantitativ gemäß des Dako-HerceptTest-Scores (Tab. 4). Demnach wurde die Anzahl der HER-2/neu-exprimierenden Zellen in Prozent bestimmt und die Vollständigkeit der Membranfärbung sowie deren Intensität bewertet. Eine mögliche zytoplasmatische Färbung fand keine Berücksichtigung in der Auswertung.

**Tabelle 3. Immunhistochemischer Nachweis des HER-2/neu-Rezeptorproteins**

Antikörper	CB11	Dako polyklonal
<b>Klonalität</b>	Monoklonal	Polyklonal
<b>Herkunft</b>	Maus	Kaninchen
<b>Epitopbindungsstelle</b>	Intrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors	Intrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors
<b>Verdünnung</b>	1:200	1:2 000
<b>Detektion</b>	Avidin-Biotin-Komplex-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
<b>Gegenfärbung</b>	Hämatoxylin nach Harris	Hämatoxylin nach Harris

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

Art der Anfärbung	IHC-Score	Einschätzung der HER-2/neu-Überexpression
Keine Färbung oder eine Membrananfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen.	0	Negativ
Eine schwache oder kaum sichtbare unvollständige Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen.	1+	Negativ
Eine schwache bis mäßige vollständige Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen.	2+	Schwach positiv
Eine starke vollständige Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen.	3+	Stark positiv

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

##### **3.1.1 FISH-Ergebnisse**

Mittels FISH wurden 150 Tumorabklatschpräparate von invasiven Mammakarzinomen angefärbt. Dazu diente das auf der Dual-color-FISH-Technik basierende PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit der Firma Vysis mit spezifischen DNA-Sonden für den Genlocus von HER-2/neu sowie den Zentromerbereich des Chromosoms 17.

Die FISH-Färbung war in 133 (88,7%) Fällen erfolgreich. Die übrigen 17 Präparate konnten auch nach Wiederholung der FISH nicht ausgewertet werden. Vor allem im Filter für das Fluorochrom SpectrumOrange lag in diesen Fällen ein stark fluoreszierender Hintergrund sowie sehr schwache bis nicht erkennbare HER-2/neu-Sondensignale vor, die Auswertkriterien (siehe 2.2.2.4) wurden somit nicht erfüllt.

Eine komplette Übersicht der Ergebnisse und histopathologischen Tumormerkmale aller untersuchten Mammakarzinome ist im Anhang (siehe 7.4) detailliert aufgeführt.

##### **HER-2/CEP17-Ratio**

Die HER-2/CEP17-Ratio wurde ermittelt, indem das Signalverhältnis von HER-2/neu zu CEP17 aus 60 gezählten Tumorzellkernen gebildet wurde. Dies erfolgte durch Division der Gesamtzahl an HER-2/neu-Signalen durch die Gesamtzahl an CEP17-Signalen. Eine Ratio  $\geq 2$  wurde nach den Vorgaben der Firma Vysis als Genamplifikation definiert.

Nach den beschriebenen Richtlinien waren 119 (89,5%) Fälle der im Rahmen dieser Arbeit mittels FISH erfolgreich angefärbten, 133 invasiven Mammakarzinome nicht amplifiziert, während 14 (10,5%) Fälle eine HER-2/neu-Genamplifikation aufwiesen (*Tab. 5*). Die HER-2/CEP17-Ratio lag in den nicht-amplifizierten Fällen zwischen 0,7 und 1,9 und in den amplifizierten Fällen zwischen 3,0 und 9,3 (*Abb. 6*).

Tabelle 5. FISH-Ergebnisse: HER-2/CEP17-Ratio

HER-2/CEP17-Ratio	Anzahl	%
< 2	119	89,5
≥ 2	14	10,5
<b>Gesamt</b>	<b>133</b>	<b>100</b>

Verteilung der HER-2/CEP17-Ratio

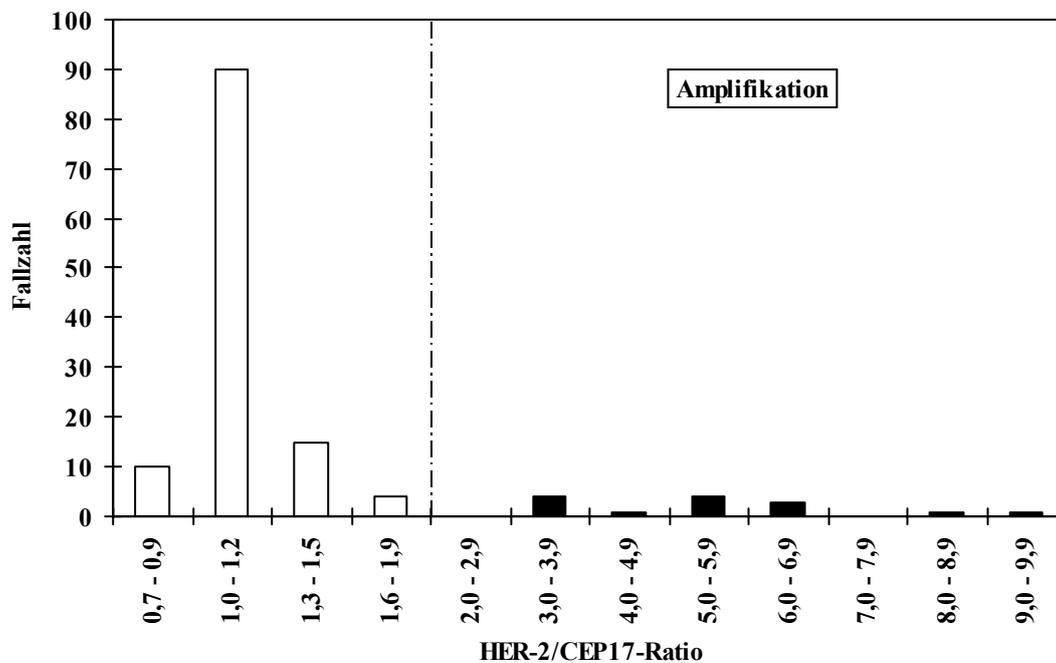


Abbildung 6. Verteilung der HER-2/CEP17-Ratio unter den nicht-amplifizierten (weiße Säulen) und amplifizierten (schwarze Säulen) Fällen.

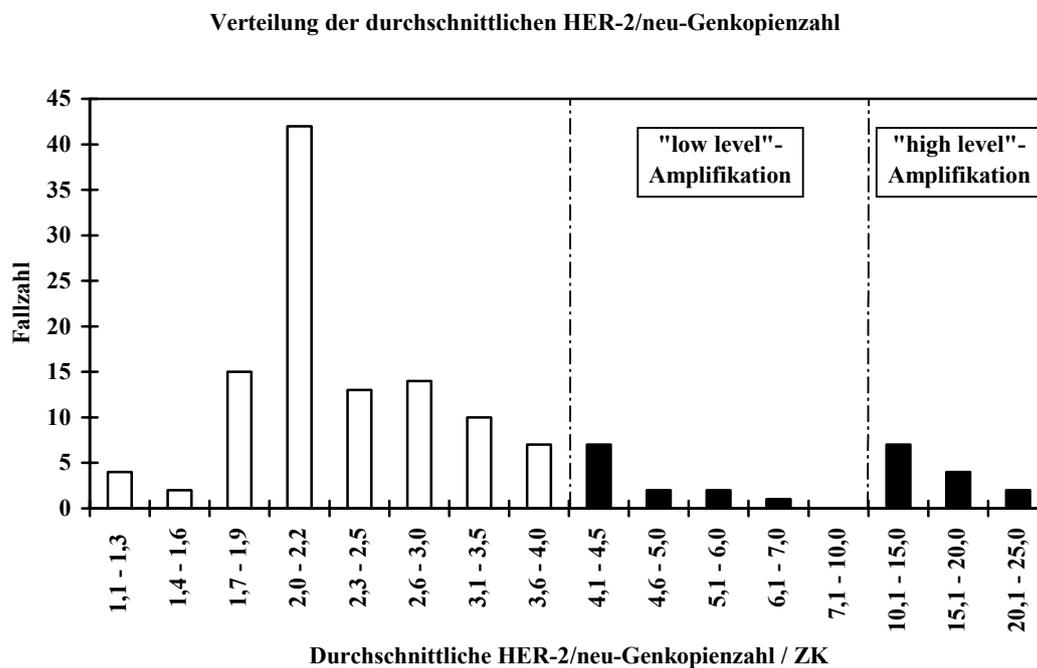
### Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl

Durch Division der HER-2/neu Signale durch 60 (Zahl der gewerteten Tumorzellkerne pro Tumorabklatschpräparat) wurde die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern für die 133 ausgewerteten Tumorabklatschpräparate berechnet. Ein Ergebnis von durchschnittlich  $> 4$  bis  $\leq 10$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern wurde als „low level“-Amplifikation und von durchschnittlich  $> 10$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern als „high level“-Amplifikation gewertet.

Im untersuchten Kollektiv lag in 107 (80,5%) Fällen keine Amplifikation vor (durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl  $\leq 4$ ). In 26 (19,5%) Fällen konnte eine Amplifikation nachgewiesen werden, wobei es sich in 12 (9,0%) Fällen um eine „low level“-Amplifikation und in 14 (10,5%) Fällen um eine „high level“-Amplifikation handelte (*Tab. 6*). Die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl lag in den nicht-amplifizierten Fällen zwischen 1,1 und 3,9, in den niedrig-amplifizierten Fällen zwischen 4,1 und 6,7 und in den hoch-amplifizierten Fällen zwischen 10,6 und 28,1 (*Abb. 7*).

**Tabelle 6. FISH-Ergebnisse: Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl**

Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl / Zellkern	Anzahl	%
$\leq 4$	107	80,5
$> 4$ bis $\leq 10$	12	9,0
$> 10$	14	10,5
<b>Gesamt</b>	133	100



**Abbildung 7.** Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern unter den nicht-amplifizierten (weiße Säulen) und amplifizierten (schwarze Säulen) Fällen.

#### Vergleich der HER-2/CEP17-Ratio mit der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern

Innerhalb der untersuchten 133 Mammakarzinomgewebeproben konnte eine Amplifikation nach Definition der HER-2/CEP17-Ratio in 14 (10,5%) Fällen und nach Definition der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl in 26 (19,5%) Fällen nachgewiesen werden. Konkordante Ergebnisse fanden sich in 121 (90,1%) der insgesamt 133 Fälle.

Die 119 Fälle mit einer HER-2/CEP17-Ratio  $< 2$  (keine HER-2/neu-Genamplifikation) zeigten in Bezug auf die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern in 107 (89,9%) Fällen keine (Abb. 8-A und 8-B) und in 12 (10,1%) Fällen eine „low level“-Amplifikation (Abb. 8-C und 8-D). In den übrigen 14 Fällen mit einer HER-2/CEP17-Ratio  $\geq 2$  (HER-2/neu-Genamplifikation) lag in 100% eine „high level“-Amplifikation (Abb. 8-E und 8-F) bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-

Genkopienzahl vor (Tab. 7). Damit waren alle „low level“-amplifizierten Fälle nach den die Chromosom 17-Anzahl miteinbeziehenden Kriterien der HER-2/CEP17-Ratio nicht amplifiziert, während alle „high level“-amplifizierten Fälle eine erhöhte Ratio im Sinne einer Genamplifikation aufwiesen.

**Tabelle 7. Vergleich: HER-2/CEP17-Ratio ↔ durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl**

Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl / Zellkern	HER-2/CEP17-Ratio		Gesamt
	< 2	≥ 2	
≤ 4	107	--	107
> 4 bis ≤ 10	12	--	12
> 10	--	14	14
<b>Gesamt</b>	119	14	133

### 3.1.2 Vergleich der HER-2/CEP17-Ratio bei unterschiedlicher Anzahl der ausgewerteten Tumorzellkerne

Die im Rahmen der FISH-Auswertung gezählten 60 Tumorzellkerne wurden für jedes der 133 erfolgreich angefärbten Mammakarzinome in drei Gruppen zu je 20 Zellkernen aufgeteilt und sowohl die durchschnittliche HER-2/CEP17-Ratio aus 60 Tumorzellkernen als auch die HER-2/CEP17-Ratio der einzelnen Gruppen bestimmt.

Lag die Durchschnittsratio im nicht-amplifizierten Bereich unter 1,7, so betrug die Abweichung der Rationes der einzelnen Gruppen pro Fall nicht mehr als 0,2. Etwa 81% der Fälle zeigten eine Abweichung in der Ratio zwischen den einzelnen Gruppen und der Durchschnittsratio von maximal 0,1 und etwa 90% von maximal 0,2 (Tab.8-A). Unter den Fällen mit einer grenzwertigen Durchschnittsratio von 1,7 bis 1,9 fand sich eine Abweichung von 0,1 bis 0,5 zwischen den Rationes der einzelnen Gruppen und der Durchschnittsratio. Bei Fällen mit einer amplifizierten Durchschnittsratio über 3,0 betrug die Abweichung bis zu 1,7 (Tab. 8-B). Die letztgenannte Gruppe umfasste ausschließlich Fälle mit „high level“-Amplifikationen, bei denen die hohe Abweichung

durch dicht liegende, nicht sicher erfassbare HER-2/neu-Signale (Cluster) bedingt und damit auswertungstechnisch begründet war.

**Tabelle 8. Vergleich der HER-2/CEP17-Ratio bei unterschiedlicher Anzahl der ausgewerteten Tumorzellkerne**

(A)

Anzahl	%	Differenz der Ratio der einzelnen Gruppen zur Durchschnittsratio	Durchschnittsratio <sup>1</sup>	HER-2/neu / ZK <sup>2</sup>
24	18,0	0,0	0,7 - 1,3	1,6 - 5,0
84	63,2	0,1	0,7 - 1,9	1,3 - 5,4
12	9,0	0,2	0,9 - 5,8	1,8 - 16,7
3	2,2	0,4	1,7 - 5,6	1,9 - 13,0
3	2,2	0,5	1,9 - 4,5	11,4 - 14,7
2	1,6	0,7	5,0 - 5,4	3,9 - 21,0
1	0,8	0,8	6,7	28,1
4	3,0	> 1	6,3 - 9,3	12,9 - 23,4

<sup>1</sup>Durchschnittsratio: HER-2/CEP-17-Ratio aus 60 ausgewerteten Tumorzellkernen.

<sup>2</sup>HER-2/neu / ZK: Durchschnittliche HER-2/neu Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

(B)

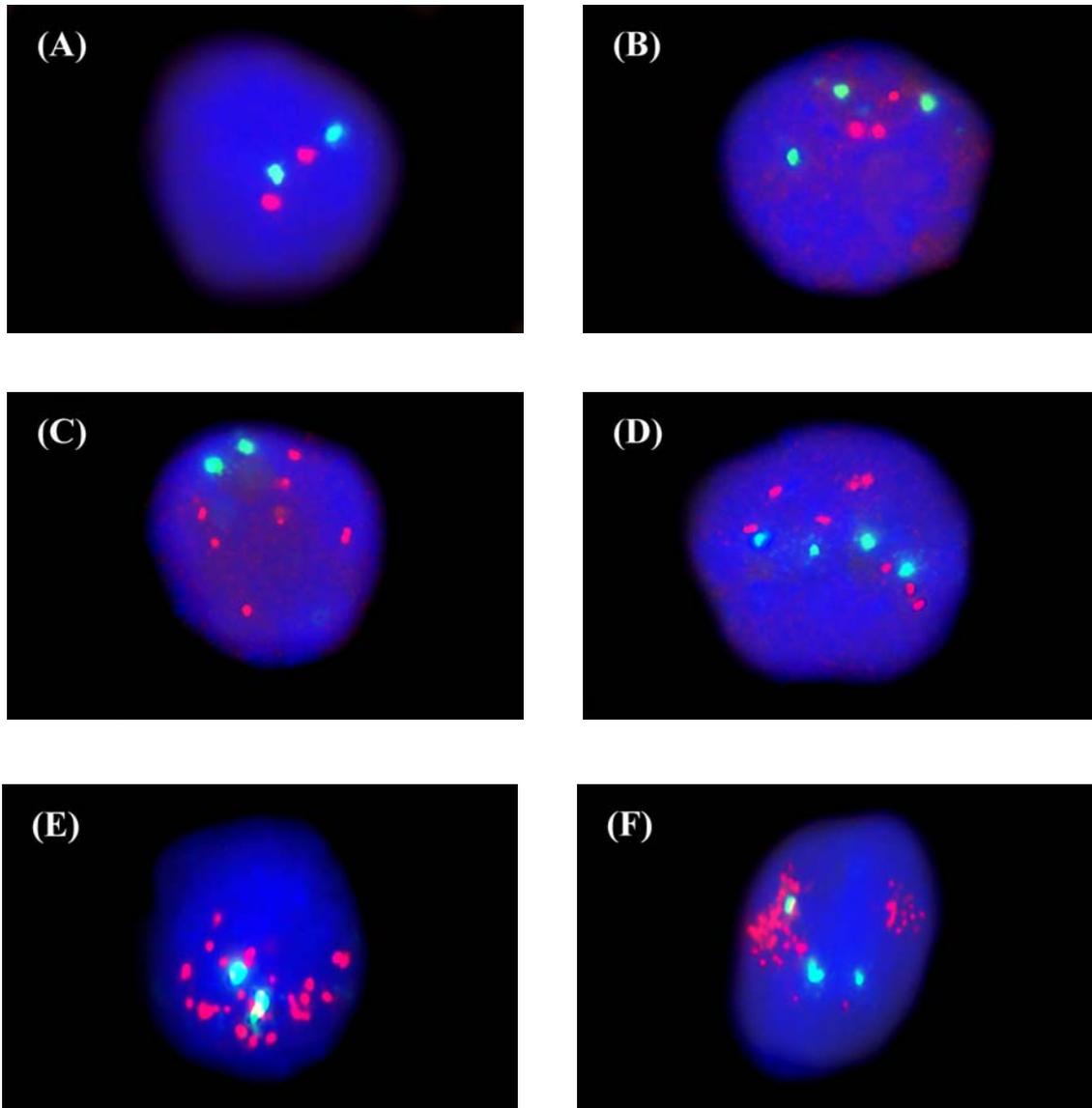
Anzahl	%	Durchschnittsratio <sup>1</sup>	Differenz der Ratio der einzelnen Gruppen zur Durchschnittsratio
116	87,2	1,0 - 1,6	0,0 - 0,2
3	2,3	1,7-1,9	0,1 - 0,5
14	10,5	3,0-9,3	0,2 - 1,7

<sup>1</sup>Durchschnittsratio: HER-2/CEP-17-Ratio aus 60 ausgewerteten Tumorzellkernen.

---

**HER-2/neu-Genstatus in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen**

---



**Abbildung 8.** HER-2/neu-Genstatus in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen. Färbung mittels Dual-color-FISH mit spezifischen DNA-Sonden für den Genlocus von HER-2/neu (rot) und den Zentromerbereich von Chromosom 17 (grün). Kerngegenfärbung mit DAPI (blau).

(A) und (B): Normaler HER-2/neu-Genstatus mit  $\leq 4$  HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.  
(C) und (D): „low level“-Amplifikation mit  $> 4$  bis  $\leq 10$  HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.  
(E) und (F): „high level“-Amplifikation mit  $> 10$  HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.

### 3.2 Immunhistochemie

#### 3.2.1 IHC-Ergebnisse

Für die mittels FISH angefärbten 150 invasiven Mammakarzinome wurden die IHC-Scores aus den Routinebefunden des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen übernommen. Die immunhistochemische Färbung des HER-2/neu-Rezeptorproteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörpern CB11 der Firma Novocastra oder dem polyklonalen Kaninchen Anti-human c-erbB-2 Onkoprotein-Antikörper der Firma Dako. Zur Detektion dieser Antikörper diente die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Vectastain® Universal Elite ABC Kit der Firma Vector Laboratories).

Nach den Vorgaben des Dako-Hercept-Test-Scores (siehe 2.2.3.4: *Tab. 4*) wurde in jedem Präparat die Anzahl der HER-2/neu-exprimierenden Zellen in Prozent bestimmt sowie die Vollständigkeit und Intensität der Membranfärbung ohne Berücksichtigung einer möglichen zytoplasmatischen Färbung bewertet. Anhand dieser Kriterien beurteilte der Pathologe 15 (10,0%) der Formalin-fixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben als stark positiv (3+), 30 (20,0%) als schwach positiv (2+) und 104 (69,3%) als negativ (0 und 1+) bezüglich einer HER-2/neu-Proteinüberexpression. In einem Fall (0,7%) mit positiver Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins war eine sichere Festlegung auf schwach oder stark positiv nicht möglich, woraus ein Hercept-Test-Score von 2+ - 3+ resultierte (*Tab 9*).

**Tabelle 9. IHC-Ergebnisse: Dako-Hercept-Test-Score**

	Anzahl	%	FISH erfolgreich	%
<b>IHC-negativ</b>	104	69,3	90	67,7
<b>0</b>	59	39,3	49	36,9
<b>1+</b>	45	30,0	41	30,8
<b>IHC-positiv</b>	46	30,7	43	32,3
<b>2+</b>	30	20,0	27	20,3
<b>2+ - 3+</b>	1	0,7	1	0,7
<b>3+</b>	15	10,0	15	11,3
<b>Gesamt</b>	150	100,0	133	100,0

Unter den mit Hilfe der FISH-Methode erfolgreich angefärbten, 133 Gewebeproben zeigten 90 (67,7%) Fälle einen negativen HercepTest-Score von 0 oder 1+. Die insgesamt 43 (32,3%) positiven Tumoren wurden in 27 (20,3%) Fällen mit 2+, in einem (0,7%) Fall mit 2+ - 3+ und in 15 (11,3%) Fällen mit 3+ bewertet (*Tab 9*).

### 3.3 Vergleich der Proteinüberexpression und Genamplifikation von HER-2/neu

#### 3.3.1 Vergleich der Ergebnisse des Dako-HercepTest-Scores mit der HER-2/CEP17-Ratio

Beim Vergleich der Ergebnisse des Dako-HercepTest-Scores mit der HER-2/CEP17-Ratio zeigten 14 der 15 Fälle (93,3%) mit einem Score von 3+ eine Genamplifikation mit erhöhter HER-2/CEP17-Ratio von  $\geq 2$ . Andererseits wies keiner der Tumoren mit einer schwach (2+) oder einer nicht sicher festlegbaren (2+ - 3+) positiven Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins eine Amplifikation auf. Auch fand sich unter den 90 Fällen mit negativem Score von 0 oder 1+ eine normale HER-2/CEP17-Ratio von  $< 2$  und damit keine Amplifikation des HER-2/neu-Gens (*Tab. 10*). Damit zeigten alle 14 Mammakarzinome mit amplifiziertem HER-2/neu-Status eine stark positive Proteinüberexpression in der immunhistochemischen Färbung.

*Tabelle 10. Vergleich: HercepTest-Score ↔ HER-2/CEP17-Ratio*

HercepTest-Score	HER-2/CEP17-Ratio		Gesamt
	$< 2$	$\geq 2$	
0	49	--	49
1+	41	--	41
2+	26	--	27
2+ - 3+	1	--	1
3+	1	14	15
<b>Gesamt</b>	118	14	133

### 3.3.2 Vergleich der Ergebnisse des Dako-Hercept-Test-Scores mit der durchschnittlichen HER-2/neu Genkopienzahl pro Tumorzellkern

Beim Vergleich der Ergebnisse des Dako-Hercept-Test-Scores mit der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern wiesen alle (100%) 14 „high level“-amplifizierten Mammakarzinome (durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl > 10) eine stark positive Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins und damit einen Hercept-Test-Score von 3+ auf.

Unter den 12 Fällen mit einer „low level“-Amplifikation (durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl > 4 bis ≤ 10) fanden sich 5 (41,7%) Fälle mit einer schwach positiven (2+) und 6 (50,0%) Fälle mit einer negativen Proteinüberexpression (0 oder 1+). Einer (8,3%) der „low level“-amplifizierten Fälle konnte mit einem Hercept-Test-Score von 2+ - 3+ nicht sicher zugeordnet werden (*Tab. 11*).

**Tabelle 11. Vergleich: Hercept-Test-Score ↔ durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl**

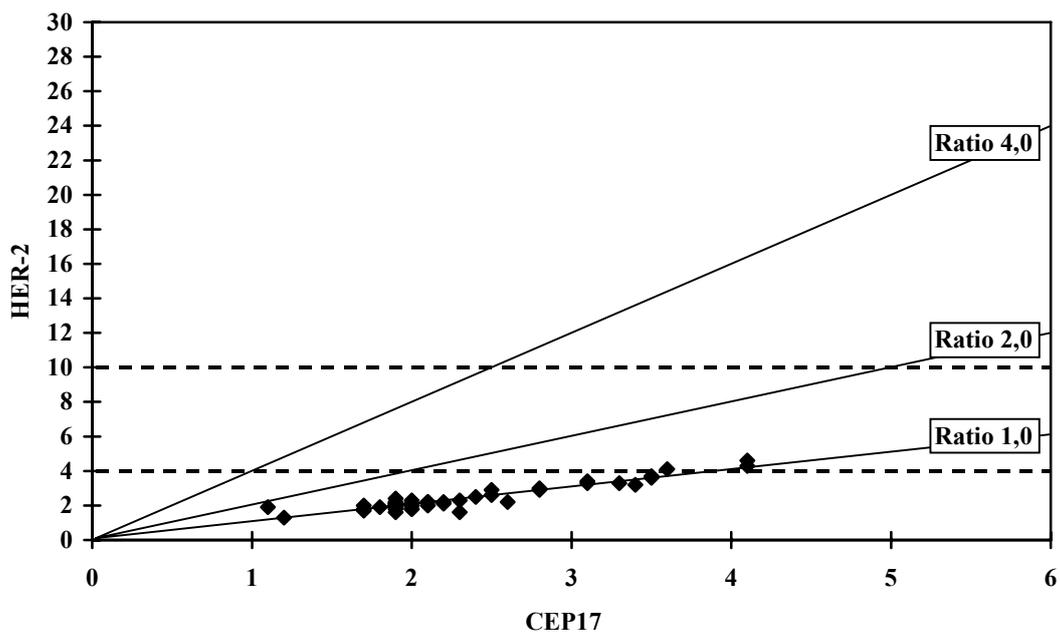
Hercept-Test-Score	Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl / Zellkern			Gesamt
	≤ 4	> 4 bis ≤ 10	> 10	
0	46	3	--	49
1+	38	3	--	41
2+	22	5	--	27
2+ - 3+	--	1	--	1
3+	1	--	14	15
<b>Gesamt</b>	107	12	14	133

### 3.3.3 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0 (Abb. 9-A)

48 (98,0%) der 49 invasiven Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0 wiesen eine normale HER-2/CEP17-Ratio von 0,7 bis maximal 1,3 auf, wobei diese in 42 (84,0%) Fällen zwischen 0,9 und 1,1 lag.

Ein Fall ohne Nachweis einer HER-2/neu-Proteinüberexpression wies eine Ratio von 1,7 auf; die durchschnittliche Signalkombination von 1,9/1,1 für die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl / durchschnittliche Chromosom 17-Zahl zeigte jedoch einen nicht-amplifizierten HER-2/neu-Status.

(A) HercepTest-Score 0 (n=49)



**Abbildung 9-A.** HER-2/neu-Genstatus mit Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu Genkopienzahl sowie der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern bei einem HercepTest-Score von 0.

**HER-2:** Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

**CEP17:** Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

Gestrichelte Linien: Schwellenwert zur „low level“- beziehungsweise „high level“-Amplifikation bei durchschnittlich > 4 beziehungsweise > 10 HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.

Bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern zeigten drei (6,1%) der untersuchten Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0 eine „low level“-Amplifikation mit Werten von 4,1, 4,3 beziehungsweise 4,6. Allerdings wies die erhöhte durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale pro Tumorzellkern von 3,6, 4,1 beziehungsweise 4,1 und die häufigste HER-2/CEP17-Signalkombination von 4/4, 4/4 beziehungsweise 3/3 in diesen Tumoren auf eine Polyploidie (siehe 3.4) hin und führte in jedem der drei Fälle zu einer normalen HER-2/CEP17-Ratio von 1,1, 1,0 beziehungsweise 1,1.

#### 3.3.4 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 1+ (Abb. 9-B)

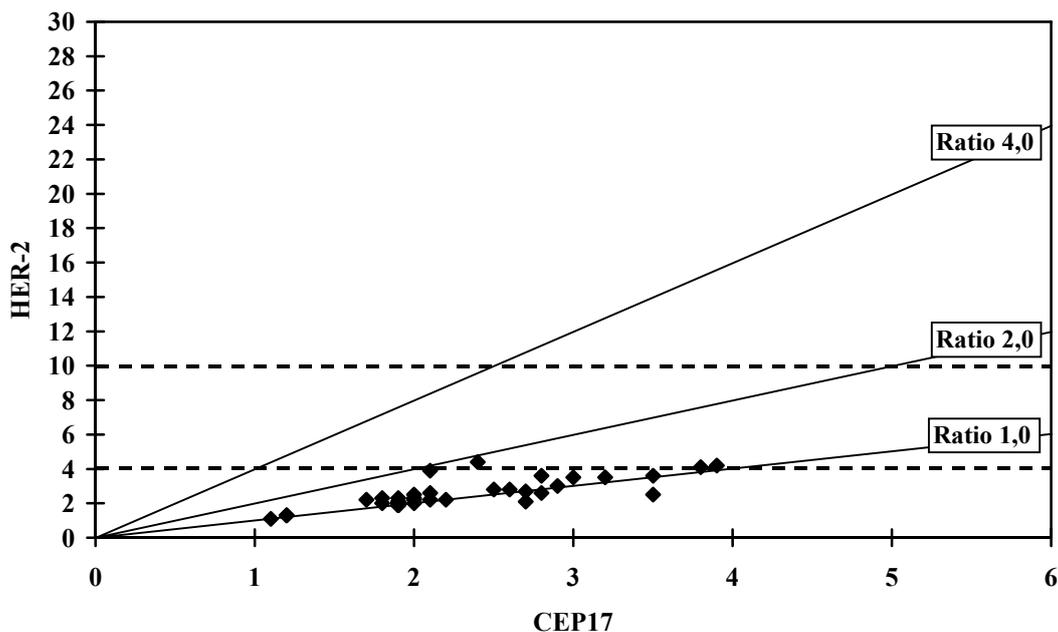
39 (95,1%) der 41 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 1+ wiesen eine normale HER-2/CEP17-Ratio von 0,7 bis maximal 1,4 auf, wobei diese in 30 (73,2%) Fällen zwischen 0,9 und 1,1 lag.

Zwei (4,9%) Tumoren mit negativer HER-2/neu-Proteinüberexpression zeigten eine im Grenzwertbereich liegende Ratio von 1,9. In einem der beiden Fälle fand sich eine durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl von 3,9, die nur knapp unter dem für eine „low level“-Amplifikation geforderten Schwellenwert von durchschnittlich  $> 4$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern lag. Die normale durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale von 2,1 und die häufigste HER-2/CEP17-Signalkombination von 4/2 wiesen auf eine grenzwertige „low level“-Amplifikation mit einer Vermehrung um 2 HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern hin. Ferner fanden sich in diesem Fall Signalkombinationen bis 8/4.

Im zweiten Tumor mit einer grenzwertigen Ratio von 1,9 lag die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl mit 4,4 über dem für eine „low level“-Amplifikation geforderten Schwellenwert von durchschnittlich  $> 4$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern. In diesem Fall fand sich eine durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale von 2,4. Die HER-2/CEP17-Signalkombination zeigte Werte bis 8/4 mit einer Häufung bei 3/2 und 4/2, was auf eine Vermehrung um 1-2 HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern hindeutete.

Innerhalb der Gruppe von Mammakarzinomen mit einem HercepTest-Score von 1+ fanden sich zwei weitere, bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern „low level“-amplifizierte Fälle mit Werten von 4,1 beziehungsweise 4,2. Wie schon bei den Fällen mit einem HercepTest-Score von 0 und „low level“-Amplifikation war auch hier die durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale pro Tumorzellkern in beiden Karzinomen auf 3,8 beziehungsweise 3,9 erhöht, was zusammen mit dem Wert der häufigsten HER-2/CEP17-Signalkombination von jeweils 4/4 auf einen Ploidie-Status der Tumorzellen hinwies. Ferner fand sich in beiden Tumoren eine normale HER-2/CEP17- Ratio von jeweils 1,1.

(B) HercepTest-Score 1+ (n=41)



**Abbildung 9-B.** HER-2/neu-Genstatus mit Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu Genkopienzahl sowie der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern bei einem HercepTest-Score von 1+.

**HER-2:** Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

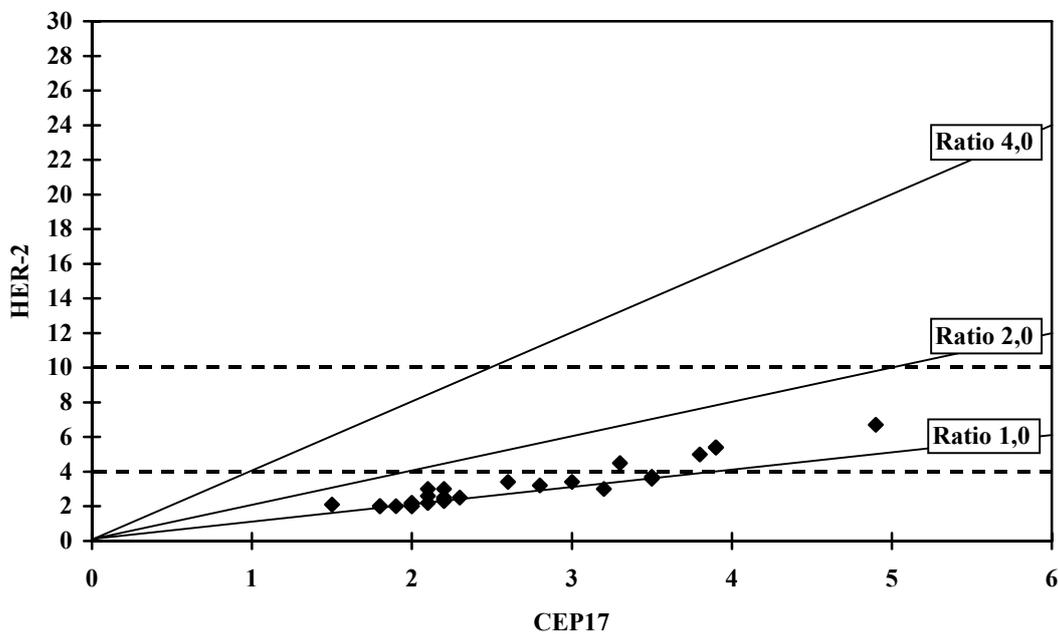
**CEP17:** Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

**Gestrichelte Linien:** Schwellenwert zur „low level“- beziehungsweise „high level“-Amplifikation bei durchschnittlich > 4 beziehungsweise > 10 HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.

### 3.3.5 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+ (Abb. 9-C)

Alle (100%) 27 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+ wiesen eine normale HER-2/CEP17-Ratio von 1,0 bis maximal 1,5 auf, wobei diese in 15 (57,7%) Fällen 1,0 oder 1,1 betrug und in 9 (34,3%) Fällen zwischen 1,2 und 1,4 lag.

(C) HercepTest-Score 2+ (n=27)



**Abbildung 9-C.** HER-2/neu-Genstatus mit Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl sowie der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern bei einem HercepTest-Score von 2+.

**HER-2:** Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

**CEP17:** Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

**Gestrichelte Linien:** Schwellenwert zur „low level“- beziehungsweise „high level“-Amplifikation bei durchschnittlich > 4 beziehungsweise > 10 HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.

Bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl lag in 5 (18,5%) Mammakarzinomen mit einem HercepTest-Score von 2+ eine „low level“-Amplifikation mit Werten von 4,5, 5,0, 5,4, 5,4 beziehungsweise 6,7 vor. Die durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale von 3,3, 3,8, 3,9, 3,9

beziehungsweise 4,9 und die häufigste HER-2/CEP17-Signalkombination von 5/4, 5/4 und 6/4, 5/4 und 6,4, 4/3 beziehungsweise 7/5 wiesen in diesen Fällen auf eine „low level“-Amplifikation mit einer Vermehrung um 1-2 HER-2/neu-Signale pro Tumorzellkern bei gleichzeitig bestehendem Ploidie-Status hin. Allerdings ergab die Berechnung der HER-2/CEP17-Ratio normal Werte von 1,3, 1,3, 1,4, 1,4 beziehungsweise 1,4.

### 3.3.6 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+ - 3+

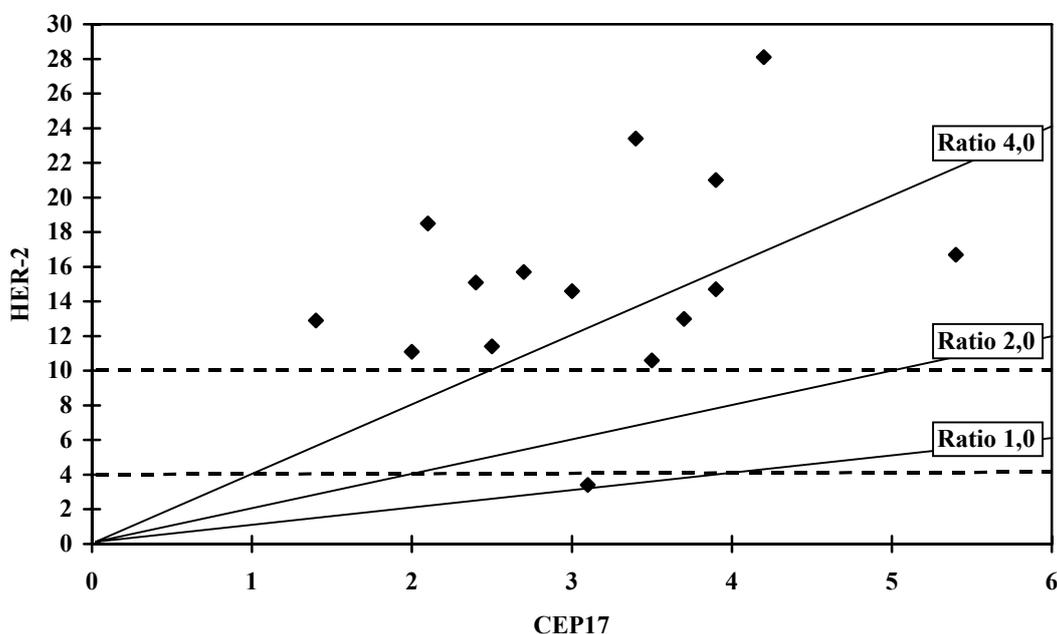
Ein Mammakarzinom zeigte eine positive Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins, deren Intensität keine sichere Festlegung des HercepTest-Scores zuließ. Die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl lag mit 4,3 über dem für eine „low level“-Amplifikation geforderten Schwellenwert von durchschnittlich  $> 4$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern. Die häufigsten HER-2/CEP17-Signalkombinationen von 4/2 und 4/3 sowie die normale Ratio von 1,6 deuteten in diesem Fall ähnlich wie in den „low level“-amplifizierten Fällen mit einem HercepTest-Score von 2+ auf eine Vermehrung um 1-2 HER-2/neu-Signale hin. Trotz der positiven Proteinüberexpression lag weder eine erhöhte HER-2/CEP17-Ratio noch eine erhöhte durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl im Sinne einer „high level“-Amplifikation vor, wie sie für Fälle mit einem HercepTest-Score von 3+ klassisch wäre.

### 3.3.7 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 3+ (Abb. 9-D)

14 (93,3%) der 15 Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 3+ wiesen eine deutlich erhöhte HER-2/CEP17-Ratio von 3,0 bis maximal 9,3 auf. Innerhalb dieser Tumoren fanden sich bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl ausschließlich „high level“-amplifizierte Fälle mit Werten von 10,6 bis 28,1. Ein Fall dieser Gruppe lag mit 10,6 knapp über dem für eine „high level“-Amplifikation geforderten Schwellenwert von durchschnittlich  $> 10$  HER-2/neu-Signalen pro

Tumorzellkern. Bei einer grenzwertigen „high level“-Amplifikation war allerdings zu bedenken, dass eine dichte Lagerung der HER-2/neu-Signale, die sogenannte Clusterbildung, eine regelhafte Auszählung erschwert oder unmöglich macht und aus diesem Grund geringere HER-2/neu-Signalzahlen und damit auch geringere HER-2/CEP-17-Rationes resultieren können.

(D) HercepTest-Score 3+ (n=15)



**Abbildung 9-D.** HER-2/neu-Genstatus mit Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu Genkopienzahl sowie der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern bei einem HercepTest-Score von 3+.

**HER-2:** Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

**CEP17:** Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

**Gestrichelte Linien:** Schwellenwert zur „low level“- beziehungsweise „high level“-Amplifikation bei durchschnittlich > 4 beziehungsweise > 10 HER-2/neu-Genkopien pro Tumorzellkern.

In einem (6,7%) der untersuchten Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 3+ fand sich eine normale HER-2/CEP17-Ratio von 1,1 mit ebenfalls normaler durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl von 3,4. Damit lag trotz stark positiver Proteinüberexpression keine Amplifikation des HER-2/neu-Gens vor. Ferner wies

dieser Fall mit einer durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl von 3,1 und einer häufigsten HER-2/CEP17-Signalkombination von 3/3 eine Polyploidie der Tumorzellen auf.

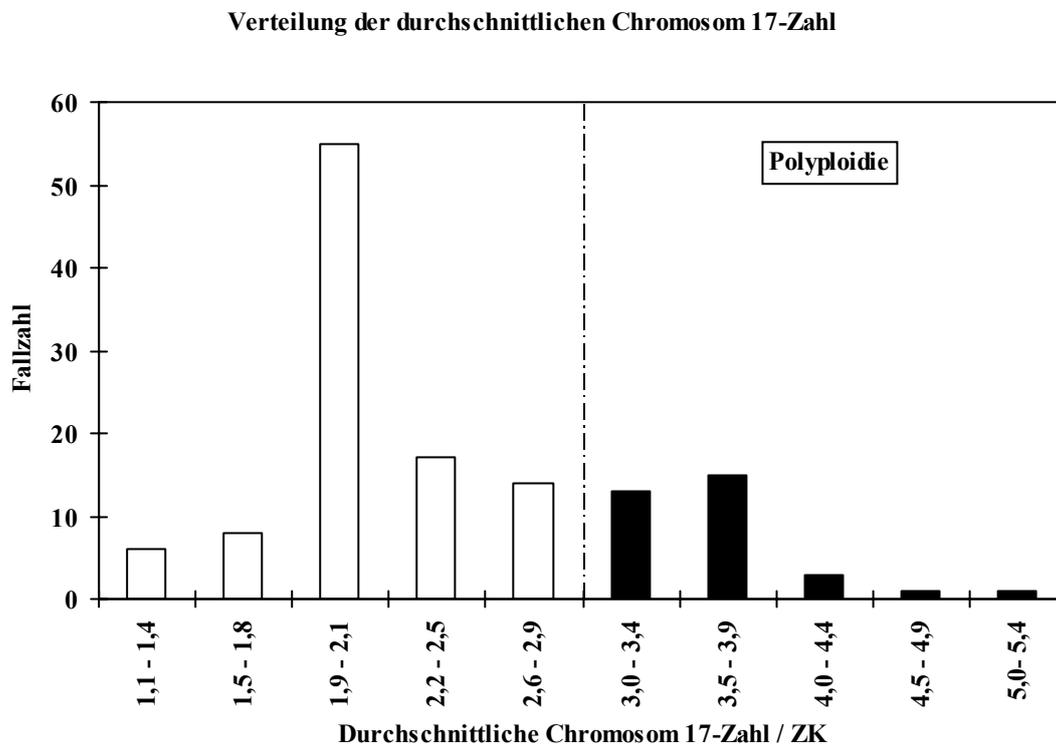
### 3.4 Polyploidie und HER-2/neu-Status

Die Kenntnis des Ploidie-Status der Tumorzellen ist für die Beurteilung des HER-2/neu-Status von Bedeutung. FISH- und IHC-Ergebnisse lassen sich bei bekannter durchschnittlicher Zahl des Chromosoms 17 pro Tumorzellkern leichter interpretieren, da so zwischen einer tatsächlichen Genamplifikation und vermehrten HER-2/neu-Signalen aufgrund einer Chromosom 17-Polyploidie differenziert werden kann.

In die Gruppe der polyploiden Mammakarzinome wurden alle Fälle aufgenommen, die pro Tumorzellkern durchschnittlich mindestens 3,0 Signale des Chromosoms 17 aufwiesen (*Abb. 10*). Nach diesem Kriterium zeigten 9 (18,0%) der 49 Fälle mit einem HercepTest-Score von 0, sieben (17,1%) der 41 Fälle mit einem HercepTest-Score von 1+, acht (29,6%) der 27 Fälle mit einem HercepTest-Score von 2+ und neun (60,0%) der 15 Fälle mit einem HercepTest-Score von 3+ eine Polyploidie der Tumorzellen (*Tab. 12*).

Unter den 24 polyploiden Karzinomen mit einem HercepTest-Score von 0 bis 2+ zeigten 10 Fälle eine „low level“-Amplifikation bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl, die HER-2/CEP17-Ratio betrug jedoch aufgrund der ebenfalls erhöhten Zahl der Chromosom 17-Signale maximal 1,4. Die anderen 14 Fälle wiesen weder im Sinne der HER-2/CEP17-Ratio noch im Sinne der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens auf.

Eine erhöhte HER-2/CEP17-Ratio von 3,1 bis 6,8 sowie eine „high level“-Amplifikation bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern fanden sich hingegen in 8 der 9 polyploiden Tumoren mit einer starken HER-2/neu-Proteinüberexpression (3+); nur ein Fall dieser Gruppe zeigte eine normale HER-2/CEP17-Ratio von 1,1.



**Abbildung 10.** Verteilung der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern unter den nicht-polyploiden (weiße Säulen) und polyploiden (schwarze Säulen) Fällen.

**Tabelle 12.** Polyploidie und HER-2/neu-Status

Anzahl	HercepTest-Score	HER-2/CEP17-Ratio	CEP17 / ZK <sup>1</sup>	HER-2/neu / ZK <sup>2</sup>
9	0	0,9 - 1,1	3,1 - 4,1	3,2 - 4,6
7	1+	0,7 - 1,4	3,0 - 3,9	2,5 - 5,4
8	2+	1,0 - 1,4	3,0 - 4,9	3,1 - 6,7
9	3+	1,1 - 6,8	3,0 - 5,4	3,4 - 28,1

<sup>1</sup>CEP 17 / ZK: Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

<sup>2</sup>HER-2/neu / ZK: Durchschnittliche HER-2/neu Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

#### **4.1.1 FISH am Tumorabklatschpräparat**

Um eine hohe Qualität mit der gewünschten Methode erreichen zu können, muss geeignetes Material verfügbar sein. Für die FISH sollte das Material als dünne Schicht vorliegen, optimal ist eine Einzellage der Zellen. Außerdem sollte möglichst wenig Hintergrund vorhanden sein, der durch Eigenfluoreszenz die Signalintensität beeinflussen kann.

Anders als im Schnittpräparat liegen die Tumorzellen im Tumorabklatschpräparat meist einzeln oder in Gruppen aus wenigen Zellen in Einzelzelllage auf dem Objektträger, wodurch eine leichtere Beurteilung der Kerngrenzen ermöglicht wird. Zudem können im Gegensatz zu Schnittpräparaten ganze Tumorzellkerne untersucht werden. Ein weiterer Vorteil der Tumorabklatschpräparate liegt in der schnelleren Präparatherstellung. So muss im Vergleich zum Schnittpräparat keine zeitaufwendige Paraffineinbettung und Schnittanfertigung erfolgen. Zusätzlich kann das Protokoll der FISH-Färbung abgekürzt werden. Paraffinschnitte müssen während der Vorbehandlung in mehreren Schritten vollständig vom Paraffin befreit werden, was bei der Verwendung von Tumorabklatschpräparaten entfällt.

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgetretenen Schwierigkeiten waren auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Manche Tumorabklatschpräparate enthielten nur wenige Tumorzellen. Bei kleinen Karzinomzellen ohne HER-2/neu-Genamplifikation war eine sichere Abgrenzung zu anderen zellulären Gewebebestandteilen nicht immer möglich, da die im Tumorabklatschpräparat meist einzeln liegenden Zellen nicht in ihrem histologischen Kontext beurteilt werden konnten. War die Tumorschnittfläche beim Abklatschen der Gewebeprobe zu feucht, kam es zu vermehrten Ablagerungen proteinreicher und damit unspezifisch fluoreszierender Flüssigkeit auf dem Objektträger, welche die Intensität der Sondensignale schwächte. Dieser störende Hintergrund war besonders im Einzelbandpassfilter für das Fluorochrom

SpectrumOrange zu beobachten und führte zu extrem schwachen HER-2/neu-Signalen, die dadurch entweder nicht sicher beurteilbar oder sogar nicht mehr sichtbar waren.

Um eine Wiederholung der FISH-Färbung möglich zu machen, sollten von Anfang an mehrere Tumorabklatschpräparate hergestellt und entsprechend gelagert werden. Grundsätzlich lassen sich zwar auch Färbungen an Tumorabklatschpräparaten wiederholen, besser ist allerdings eine Wiederholung der Untersuchung an neuem, noch nicht behandeltem Material. Aufgrund der routinemäßigen Aufbewahrung von Paraffinblöcken entfällt dieser zusätzliche Asservierungsaufwand beim Paraffinschnitt. Zudem lassen sich am Paraffinmaterial durchschnittlich bis zu 200 weitere Untersuchungen durchführen.

Sowohl das Tumorabklatschpräparat als auch der Paraffinschnitt weisen ihre eigenen Vor- und Nachteile auf. Beide Methoden sind für die FISH hinsichtlich der Durchführbarkeit und Auswertung geeignet.

#### 4.1.2 Vor- und Nachteile der FISH

Die FISH-Methode ermöglicht den Nachweis einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens. Derzeit sind zwei kommerziell erhältliche, standardisierte FISH-HER-2/neu-Testkits von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zur Untersuchung des HER-2/neu-Genstatus zugelassen. Sie ermöglichen eine einfache Durchführbarkeit der FISH-Färbung. Das Inform™-Kit der Firma Ventana/Oncor enthält nur eine DNA-Sonde für den HER-2/neu-Genlocus, während das PathVysion™-Kit der Firma Vysis zusätzlich eine DNA-Sonde für den Zentromerbereich des Chromosoms 17 beinhaltet. Mit beiden Verfahren kann im Gegensatz zum Southern-Blot die HER-2/neu-Genkopienzahl in individuellen Tumorzellkernen bestimmt werden, während für eine Differenzierung zwischen tatsächlicher Genamplifikation und vermehrten HER-2/neu-Genkopien aufgrund einer Chromosom 17-Polyploidie nur die Dual-color-FISH-Technik des PathVysion™-Kits geeignet ist. Eine Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins ohne nachweisbare Genamplifikation, die zumindest in einem kleinen Teil der Fälle (3-10%) auftritt [Slamon et al. 1989a, Kallioniemi et al. 1992, Pauletti et al. 1996, Persons

et al. 1997, Jacobs et al. 1999, Jimenez et al. 2000, Lebeau et al. 2001] wird mittels FISH allerdings nicht erfasst.

Gegenüber der Immunhistochemie zeigt die FISH eine höhere Sensitivität und Spezifität [Pauletti et al. 1996, Press et al. 1997, Ross und Fletcher 1999] sowie eine höhere Reproduzierbarkeit [Jacobs et al. 2000, Persons et al. 2000]. Außerdem ist diese Methode aufgrund einer relativen Stabilität der DNA gegenüber Unterschieden in der Gewebefixierung und –verarbeitung weniger empfindlich als die Immunhistochemie [Greer et al. 1991, Wang et al. 2000].

Die Durchführung der FISH-Technik setzt voraus, dass die anwendenden Labors über eine spezielle Ausstattung wie beispielsweise ein Fluoreszenzmikroskop sowie eine spezielle Expertise verfügen. Zudem ist der Kosten- und Zeitaufwand deutlich höher im Vergleich zur Immunhistochemie [Jacobs et al. 1999, Tanner et al. 2000, Wang et al. 2000, Hanna 2001, Lebeau et al. 2001, Leyland-Jones 2001, Perez et al. 2002].

#### 4.1.3 FISH zur Bestimmung des HER-2/neu-Status

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung des HER-2/neu-Status auf Genebene durch Verwendung des PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit der Firma Vysis. Zwei verschiedenfarbig Fluorochrom-direktmarkierte DNA-Sonden ermöglichen die gleichzeitige Darstellung der HER-2/neu-Genkopien und der Anzahl des Chromosoms 17.

Zur Auswertung der FISH-Färbung wurde die HER-2/CEP17-Ratio durch Division der Gesamtzahl an HER-2/neu-Signalen durch die Gesamtzahl an CEP17-Signalen aus 60 gezählten Tumorzellkernen berechnet. Eine Ratio  $\geq 2$  wurde als Amplifikation des HER-2/neu-Gens gewertet, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,2 Grenzwerte darstellten und zum Übergangsbereich gehörten. Zudem wurde in Anlehnung an die Vorgaben des Inform™-Kit der Firma Ventana/Oncor die durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern bestimmt. Bei Werten  $> 4$  lag eine Amplifikation vor. Zusätzlich erfolgte eine Differenzierung zwischen „low level“-amplifizierten

beziehungsweise „high level“-amplifizierten Fällen bei durchschnittlich  $> 4$  bis  $\leq 10$  beziehungsweise  $> 10$  HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern.

Probleme bei der Auswertung gab es beim Vorliegen sogenannter gesplitteter Signale. Wenn sich ein Einzelsignal in Form von zwei kleineren, räumlich leicht getrennt voneinander liegenden Signalen darstellte, war die Entscheidung oftmals schwierig, ob es sich dabei um ein oder zwei HER-2/neu-Signale handelte. Dies galt auch unter Berücksichtigung der geringeren Fluoreszenzleuchtkraft von gesplitteten Signalen verglichen mit nicht-gesplitteten Einzelsignalen. Besonders bei Zellkernen mit einer HER-2/CEP17-Signalkombination  $< 1$  (zum Beispiel 2/3) stellte sich bei gesplitteten Signalen die Frage, ob eventuell doch zwei getrennte Einzelsignale vorliegen.

Da die Auswertung von 60 Tumorzellkernen in der Praxis bisweilen zeitaufwendig ist, genügt nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (siehe 3.1.2) bei Fällen mit einer HER-2/CEP17-Ratio bis 1,5 das Auszählen von 20 Tumorzellkernen zur Ratiobildung. Dies gilt auch für Karzinome mit einer Ratio weit über 2,0, da in den „high level“-amplifizierten Fällen eine höhere Abweichung der Ratio von 1,0 oder mehr durch Clusterbildung der HER-2/neu-Signale bedingt ist und keine Rolle in der Therapieentscheidung spielt. Bei einer Ratio um den Grenzbereich von 1,6 bis etwa 2,4 sollten hingegen mindesten 60 Tumorzellkerne pro Fall ausgezählt werden, da in diesem Bereich Schwankungen in der Auswertung zwischen normalem Genstatus und einer HER-2/neu-Amplifikation entscheiden.

## **4.2 Immunhistochemie**

### 4.2.1 IHC am Paraffinschnitt

Die Qualität der IHC am Paraffinschnitt ist wesentlich von der Schnittdicke und der Schnittqualität abhängig. Insbesondere bei fettreichen Karzinomgeweben kann durch das Fett die Schnitterstellung erschwert sein; es resultieren eine Erhöhung der Schnittdicke und eine Verminderung der Schnittqualität. Die erhöhte Schnittdicke führt

während der Vorbehandlung leichter zu einer Ablösung des Paraffinschnittes vom Objektträger oder zu einem Umschlagen des Gewebes mit nachfolgend schlechter Auswertbarkeit.

Eine Wiederholung der immunhistochemischen Färbung am Paraffinmaterial ist unproblematisch; es können durchschnittlich bis zu 200 weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Da ein Paraffinblock routinemäßig aufbewahrt wird, entsteht bei der IHC am Paraffinschnitt kein zusätzlicher Asservierungsaufwand. Gefrierschnitte werden in der Routine nur noch dann eingesetzt, wenn keine sogenannten Paraffin-gängigen Antikörper zur Diagnostik zur Verfügung stehen.

#### 4.2.2 Vor- und Nachteile der IHC

Die IHC ermöglicht den Nachweis einer Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins. Sie stellt ein relativ schnelles und vergleichsweise kostengünstiges Verfahren dar. Die Technik erfordert einen geringeren methodischen Aufwand als die FISH und ist im allgemeinen in pathologischen Instituten etabliert [Hoang et al. 2000, Pauletti et al. 2000, Wang et al. 2000, Leyland-Jones 2001, Perez et al. 2002]. Ferner kann mittels IHC auch in den seltenen Fällen (3-10%) eine HER-2/neu-Proteinüberexpression nachgewiesen werden, in denen eine Genamplifikation fehlt [Slamon et al. 1989a, Kallioniemi et al. 1992, Pauletti et al. 1996, Persons et al. 1997, Jacobs et al. 1999, Jimenez et al. 2000, Lebeau et al. 2001].

Zur Bestimmung der HER-2/neu-Proteinexpression stehen viele verschiedene Anti-HER-2/neu-Antikörper mit einer hohen Variabilität bezüglich der Sensitivität und der Spezifität zur Verfügung [Busmanis et al. 1994, Press et al. 1994b]. Außer von der Wahl der Antikörper sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung vom präparativen Vorgehen, der Antigendemaskierung sowie Unterschieden in der Gewebefixierung und der Gewebeerarbeitung abhängig [Wang et al. 2000, Bartlett et al. 2001, Hanna 2001, Leyland-Jones 2001]. So zeigen beispielsweise verschiedene Antikörper je nach Fixierung verschiedene Farbeintensitäten [Penault-Llorca et al. 1994].

Unterschiedliche Auswertungsschemata [Press et al. 1993, Press et al. 1994b, Allred et al. 1998, Hanna 2001] und eine subjektive Bewertung der HER-2/neu-Proteinüberexpression [Hoang et al. 2000, Bartlett et al. 2001] erschweren einen Vergleich verschiedener Ergebnisse. Derzeit ist von der FDA (Food and Drug Administration, USA) nur ein kommerziell erhältliches, standardisiertes HER-2/neu-Testkit, der HercepTest™ der Firma Dako, zur immunhistochemischen Bestimmung der Expression des HER-2/neu-Rezeptorproteins freigegeben. Die Vorteile des HercepTests liegen in einem einfachen Protokoll, standardisierten Reagenzien sowie einem standardisierten Auswertungsschema [Hanna 2001]. Bemängelt wird allerdings eine Überbewertung der HER-2/neu-Proteinüberexpression mit falsch-positiven Ergebnissen sowie eine geringe Spezifität [Jacobs et al. 1999, Maia 1999, Roche und Ingle 1999, Pauletti et al. 2000].

#### 4.2.3 IHC zur Bestimmung des HER-2/neu-Status

Die Expression des HER-2/neu-Rezeptorproteins wurde in der vorliegenden Arbeit nach den Kriterien des HercepTest-Scores (siehe 2.2.3.4: *Tab. 4*) bewertet. Dieser Score umfasst vier Einteilungen von 0 bis 3+. Während ein Score von 0 oder 1+ keine Überexpression darstellt, liegt hingegen bei einem Score von 2+ eine schwache und bei einem Score von 3+ eine starke HER-2/neu-Proteinüberexpression vor. Dabei erfordert ein Score von 2+ eine schwache bis mäßige, jedoch vollständige Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen, bei einem Score von 3+ muss die vollständige Membranfärbung kräftig ausgeprägt sein. Theoretisch sind die einzelnen Gruppen klar voneinander getrennt. In der Praxis ist eine Unterscheidung zwischen schwach, mäßig und kräftig jedoch bisweilen sehr schwer zu treffen. Auch kann die Differenzierung zwischen einer inkompletten und einer kompletten Zellmembranfärbung und damit zwischen einem Score von 1+ und 2+ Probleme aufwerfen. So wäre bei einem Score von 2+ eine Herceptin®-Therapie zu überdenken, bei einem Score von 1+ wird nicht therapiert.

Die Bestimmung des semiquantitativen HercepTest-Scores durch den Pathologen war unter anderem von der Wahl des Objektivs (verschiedene Vergrößerungen), von der Wahl der Lichtstärke im Mikroskop und vom ständigen Durchfokussieren des Präparates während der Auswertung abhängig. Ohne Beurteilung der Zellmembran auf mehreren Schärfenebenen konnte beispielsweise die Vollständigkeit einer Membrananfärbung übersehen werden. Bei Verwendung eines höheren Objektivs und einer größeren Lichtstärke erschien die Färbung intensiver. Ferner resultierte aus einem dünneren Gewebeschnitt eine geringere Signalintensität, da das lichtmikroskopisch sichtbare Signal der immunhistochemischen Färbung durch eine Aufsummierung von Einzelsignalen entsteht. Die Problematik bei der Beurteilung des HercepTest-Scores, speziell bei einer Differenzierung zwischen 1+ und 2+ beziehungsweise 2+ und 3+, wurde im Rahmen von Fortbildungsveranstaltungen im Kollegenkreis bestätigt und diskutiert.

#### **4.3 Vergleich von FISH und IHC**

In der vorliegenden Arbeit zeigten 104 (69,3%) der 150 untersuchten Mammakarzinome einen HercepTest-Score von 0 oder 1+. Eine Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins fand sich in 46 (30,7) Fällen, wobei der HercepTest-Score in 30 (20%) Fällen mit 2+, in einem (0,7%) Fall mit 2+ - 3+ und in 15 (10%) Fällen mit 3+ bewertet wurde. In der Literatur weisen durchschnittlich 20-30% der Mammakarzinome eine HER-2/neu-Proteinüberexpression auf [Slamon et al. 1987, Slamon et al. 1989a, Press et al. 1993, Revillion et al. 1998]. Die Streubreite liegt jedoch zwischen 5 und 55% [Revillion et al. 1998]. Wie bereits beschrieben (siehe 4.2.2) liegen diese Unterschiede in der Verwendung verschiedener Antikörper [Press et al. 1994b, Lebeau et al. 2001], verschiedener Gewebefixierungen und Gewebeverarbeitungen [Wang et al. 2000, Hanna 2001, Lebeau et al. 2001], verschiedener Auswertungsschemata [Press et al. 1993, Press et al. 1994b, Allred et al. 1998, Hanna 2001] sowie in der Auswertung unterschiedlicher Tumorarten begründet.

So zeigen etwa 20-30% der invasiven duktaalen Mammakarzinome laut Literatur eine Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins, während die invasiven lobulären Mammakarzinome in nur etwa 7% überexprimiert sind [Palacios et al. 1995, Revillion et al. 1998, Etorh et al. 1999].

Der Anteil der amplifizierten invasiven Mammakarzinome lag nach den Kriterien der HER-2/CEP17-Ratio bei 9% und damit deutlich unter dem erwarteten Wert von 20-30%, während nach den Kriterien der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern 19,5% der untersuchten Tumoren eine Amplifikation aufwiesen.

Für die FISH und die IHC wird eine hohe Konkordanz beschrieben [Isola et al. 1999, Jacobs et al. 1999, Hoang et al. 2000, Jimenez et al. 2000, Mass et al. 2000, Ridolfi et al. 2000, Wang et al. 2000, Birner et al. 2001, Lebeau et al. 2001, Lehr et al. 2001, Onody et al. 2001]. Unterteilt man jedoch die Proteinüberexpression in schwach (2+) und stark positiv (3+), so ergibt sich eine hohe Übereinstimmung bei einem Score von 3+, während bei einem Score von 2+ die Übereinstimmung deutlich geringer ausfällt [Hoang et al. 2000, Mass et al. 2000, Vogel et al. 2001].

Tumoren mit einer stark positiven Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins weisen im allgemeinen in über 90% der Fälle eine Genamplifikation auf [Isola et al. 1999, Lebeau et al. 1999, Jimenez et al. 2000, Tanner et al. 2000, Wang et al. 2000, Tsuda et al. 2001, McCormick et al. 2002]. Auch in der vorliegenden Arbeit waren abgesehen von einer Ausnahme die Fälle mit einem HercepTest-Score von 3+ mit einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens korreliert (93,3%).

Obwohl ein immunhistochemischer Score von 2+ als schwache Proteinüberexpression gewertet wird, findet sich nur in 12-35% der Fälle eine Genamplifikation [Persons et al. 1997, Buehler et al. 2000, Kakar et al. 2000, Mass et al. 2000, Starr et al. 2000, Tanner et al. 2000, Lebeau et al. 2001, Tsuda et al. 2001, Tubbs et al. 2001, Perez et al. 2002], welche eigentlich die Ursache für die Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins darstellen sollte. Im untersuchten Kollektiv der Tumoren mit einem HercepTest-Score von 2+ fand sich nach den Kriterien der HER-2/CEP-17-Ratio kein Fall mit einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens, was sicherlich als zufallsbedingt zu bewerten ist. Bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern zeigten allerdings 5 der untersuchten Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+

sowie der Fall mit einem HercepTest-Score von 2+ - 3+ eine „low level“-Amplifikation mit Werten von 4,3 bis 6,7. Die häufigsten HER-2/CEP17-Signalkombinationen von 4/3 bis 7/5 wiesen auf eine Erhöhung um 1-2 HER-2/neu-Signale pro Tumorzellkern hin, die zu einer schwach positiven Proteinüberexpression führte und mit den HER-2/CEP17-Rationes von 1,3 bis 1,6 nicht erkannt wurde. Vielleicht ist in solchen Fällen die Absolutzahl der HER-2/neu-Signale pro Tumorzellkern zur Beurteilung des HER-2/neu-Status besser geeignet, da durch die Bildung der HER-2/CEP17-Ratio eine geringe Genamplifikation übersehen werden kann.

Eine Proteinüberexpression ohne nachweisbare Amplifikation des HER-2/neu-Gens war in der vorliegenden Arbeit deutlich häufiger als erwartet. So zeigten 23,7% (HER-2/CEP17-Ratio < 2) beziehungsweise 21,5% (durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern  $\leq 4$ ) der nicht-amplifizierten Mammakarzinome eine Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins, wobei nur ein Fall (2,3%) einen stark positiven HercepTest-Score von 3+ aufwies. In der Literatur wird eine Spannbreite von 3-10% beschrieben [Slamon et al. 1989a, Kallioniemi et al. 1992, Pauletti et al. 1996, Persons et al. 1997, Jacobs et al. 1999, Jimenez et al. 2000, Lebeau et al. 2001]. Die auffällig hohen Werte der vorliegenden Untersuchung sind auf den monoklonalen Antikörper CB11 der Firma Novocastra zurückzuführen, der im Institut für Pathologie der Universität Tübingen bis Anfang 2001 routinemäßig zur immunhistochemischen Färbung des HER-2/neu-Rezeptorproteins eingesetzt wurde. Es zeigte sich, dass bei Verwendung des CB11-Antikörpers in Verbindung mit dem sehr sensitiven ABC-Detektionskit der Firma Vector bei gängigen Verdünnungen mehr Fälle mit einem schwach positiven HercepTest von 2+ diagnostiziert wurden als mit dem polyklonalen Antikörper der Firma Dako [Gaedcke 2003]. Diese Beobachtung wird durch die Literatur einerseits bestätigt [Bartlett et al. 2001] und andererseits widerlegt [Lebeau et al. 2001]. Die Entstehungsmechanismen einer HER-2/neu-Proteinüberexpression in nicht-amplifizierten Tumoren sind nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden verschiedene molekulare Ereignisse wie beispielsweise eine Aktivierung auf Transkriptions- oder Posttranskriptionsebene, die zu einer gesteigerten Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche führt [Slamon et al. 1987, Earp et al. 1995]. Ferner besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen der

immunhistochemischen Färbung [Tsuda et al. 2001]. Auch die Auswirkung einer Chromosom 17-Polyploidie auf die HER-2/neu-Proteinexpression ist nicht sicher geklärt; sie scheint jedoch bis auf wenige Ausnahmen keine signifikante Rolle zu spielen [Wang et al. 2002]. In der vorliegenden Arbeit waren die polyploiden Fälle gleichmäßig auf die vier verschiedenen HercepTest-Scores verteilt. Ein untersuchter Tumor mit einer stark positiven Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors (3+) ohne erfassbare Genamplifikation wies eine Polyploidie mit durchschnittlicher Zahl des Chromosoms 17 von 3,1 und häufigster HER-2/CEP17-Signalkombination von 3/3 auf. Es ist in diesem Fall mit normaler HER-2/CEP17-Ratio von 1,1 nicht sicher auszuschließen, dass der Ploidie-Status für die Proteinüberexpression verantwortlich ist. Wahrscheinlicher ist allerdings eine Transkriptionssteigerung mit erhöhten mRNA-Konzentrationen, was mittels quantitativer RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) oder Northern Blot abgeklärt werden müsste.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit HER-2/neu-Proteinüberexpression ohne Genamplifikation ist statistisch nicht von denjenigen Patientinnen zu unterscheiden, die sowohl mittels IHC als auch mittels FISH negativ getestet wurden. Hingegen haben Patientinnen mit amplifizierten, jedoch immunhistochemisch negativen Mammakarzinomen eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patientinnen mit HER-2/neu-überexprimierenden Tumoren ohne nachweisbare Genamplifikation [Pauletti et al. 2000].

In der Gruppe der immunhistochemisch negativen Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0 oder 1+ zeigten alle Fälle eine normale HER-2/CEP17-Ratio < 2; nach den Kriterien der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern fand sich allerdings in 6 (6,7%) Tumoren eine „low level“-Amplifikation mit Werten von 4,1 bis 4,6. Die ebenfalls erhöhte durchschnittliche Zahl der Chromosom 17-Signale von 3,6 bis 4,1 und die häufigsten HER-2/CEP17-Signalkombinationen von 3/3 oder 4/4 wiesen jedoch in 5 dieser Fälle auf eine Polyploidie der Tumorzellen hin. Nur in einem (1,1%) Fall mit einem HercepTest-Score von 1+ deutete die grenzwertige HER-2/CEP17-Ratio von 1,9, die durchschnittliche HER-2/CEP17-Signalkombination von 4,4/2,4 sowie die Häufung der HER-2/CEP17-Signalkombination bei 3/2 und 4/2 auf eine Vermehrung um 1-2 HER-2/neu-Signale

und damit auf eine geringe Amplifikation des HER-2/neu-Gens hin. Eine Genamplifikation ohne erfassbare Proteinüberexpression wird in der Literatur in 2-9% der Fälle berichtet [Slamon et al. 1989a, Ciocca et al. 1992, Jacobs et al. 1999, Hoang et al. 2000, Lebeau et al. 2001, McCormick et al. 2002]. Gründe hierfür könnten in einer abnormen oder herunterregulierten Transkription oder Translation mit konsekutiv abnormer Proteinproduktion beziehungsweise geringerer Proteinexpression liegen [Lebeau et al. 2001]. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Behandlung des Tumorgewebes durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung zu einem Antigenitätsverlust der HER-2/neu-Rezeptoren führt [Khan et al. 2002]. Ferner könnte in diesen Fällen bei Verwendung der Mono-color-FISH-Technik mit ausschließlicher Berechnung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern eine Chromosom 17-Polyploidie vorliegen [Jacobs et al. 1999].

#### **4.4 Bewertung von FISH und IHC**

Sowohl die FISH als auch die IHC sind aufgrund ihrer Durchführbarkeit und Auswertung zur Bestimmung des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomzellen geeignet.

Unter der Voraussetzung, dass für eine Therapie mit dem monoklonalen Anti-HER-2/neu-Antikörper Herceptin® eine Amplifikation vorliegen muss, wäre der FISH-Test alleine zur Bestimmung des HER-2/neu-Status ausreichend. Für diese Methode stellt das Tumorabklatschpräparat eine geeignete Alternative zum routinemäßig eingesetzten Paraffinschnitt dar, wobei seine Vorteile in der schnelleren Präparatherstellung ohne Formalinfixierung, Paraffineinbettung und Schnittanfertigung sowie dem weniger aufwendigen Färbeprotokoll und der Auswertung ganzer Tumorzellkerne in Einzelzellige begründet sind. Allerdings ist beim Tumorabklatschpräparat die Anzahl der anfertigten Präparate und damit durchführbaren Färbungen limitiert und der Asservierungsaufwand deutlich höher als beim Schnittpräparat mit routinemäßiger Aufbewahrung der Paraffinblöcke.

Im Falle der alleinigen Verwendung der FISH-Technik würden jedoch jene Mammakarzinome übersehen, welche mit einer Überexpression des Rezeptorproteins ohne nachweisbare Genamplifikation einhergehen. Ferner ist der Materialwert eines FISH-Tests mit etwa 60 Euro pro Fall erheblich höher im Verhältnis zur IHC mit etwa 5-10 Euro pro Fall. Weitere Vorteile des immunhistochemischen Tests bestehen im geringeren methodischen Aufwand und einer schnelleren Auswertung ohne spezielle Auswertungstabellen oder Berechnungen von Rationes. Nachteilig wirkt sich bei der IHC aus, dass durchschnittlich nur etwa ein Viertel aller Fälle mit einer schwach positiven Proteinüberexpression (Score 2+) auch eine Genamplifikation aufweist und dass eine eindeutige Bestimmung des immunhistochemischen Scores nicht immer möglich ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das derzeit international empfohlene und routinemäßig etablierte Vorgehen, zuerst alle Fälle mittels IHC zu untersuchen. Beträgt der Score 3+, so liegt mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens vor. Eine FISH-Untersuchung ist dann auch deshalb hinfällig, da eine starke Rezeptorüberexpression auf der Zellmembranoberfläche vorliegt und der Tumor auf Herceptin® ansprechen müsste. Bei Fällen mit einem Score von 0 oder 1+ ist eine FISH-Testung ebenfalls nicht nötig, da eine Amplifikation ohne Überexpression kaum vorkommt. Selbst im Falle dieser Kombination dürfte sich eine Herceptin®-Therapie erübrigen, da der Antikörper nicht an die Tumorzellen binden kann. Im Gegensatz dazu ist eine FISH-Untersuchung bei Fällen mit einem Score von 2+ zum Nachweis einer möglichen Genamplifikation sinnvoll, da immunhistochemisch schwach positive (2+) und gleichzeitig amplifizierte Mammakarzinome die gleiche klinische Ansprechrate wie immunhistochemisch stark positive (3+) Tumoren zeigen. Zudem sollte eine FISH-Testung zusätzlich immer dann durchgeführt werden, wenn die immunhistochemische Auswertung unsicher erscheint.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Die Kenntnis des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomzellen ist zur Entscheidung bezüglich einer Immuntherapie mit Herceptin® notwendig. Dieser humanisierte monoklonale Antikörper ist gegen das HER-2/neu-Rezeptorprotein gerichtet, dessen Überexpression auf der Zellmembranoberfläche Voraussetzung für eine wirksame Therapie ist. In den meisten Fällen beruht eine Proteinüberexpression auf einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens.

In der vorliegenden Arbeit wurde der HER-2/neu-Status von 150 Mammakarzinomen mittels FISH untersucht und mit der immunhistochemischen, membranassoziierten Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins verglichen.

Die Bestimmung einer Genamplifikation mittels FISH erfolgte an Tumorabklatschpräparaten mit dem PathVysion™ HER-2/neu DNA Sonden-Kit der Firma Vysis. Zur Beurteilung der Proteinüberexpression mittels IHC an Formalinfixierten, in Paraffin-eingebetteten Gewebeproben diente der monoklonale Antikörper CB11 der Firma Novocastra oder der polyklonale Kaninchen Anti-human c-erbB-2 Onkoprotein-Antikörper der Firma Dako.

Die FISH war in 133 der 150 angefärbten Tumorabklatschpräparate erfolgreich. Nach den Kriterien der HER-2/CEP17-Ratio zeigten 10,5% der Fälle eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens. Bei ausschließlicher Bewertung der Absolutzahl des HER-2/neu-Sondensignals mit Berechnung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern wiesen 9,0% der Fälle eine „low level“- und 10,5% der Fälle eine „high level“-Amplifikation auf. Die immunhistochemischen Scores wurden aus den Routinebefunden des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen übernommen und in 20,3% der Fälle als schwach positiv (2+) und in 11,3% der Fälle als stark positiv (3+) beurteilt. In einem Fall (0,7%) war eine sichere Zuordnung nicht möglich (2+ - 3+). Eine stark positive Proteinüberexpression ging bis auf eine Ausnahme immer mit einer „high level“-Amplifikation einher. Unter den Mammakarzinomen mit schwach positiver Proteinüberexpression fand sich nur in 18,5% der Fälle eine „low level“-Amplifikation bezüglich der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl, während die HER-2/CEP17-Ratio stets nicht-amplifizierte Werte aufwies.

Sowohl die FISH als auch die IHC sind aufgrund ihrer Durchführbarkeit und Auswertung zur Bestimmung des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomzellen geeignet. Für die FISH-Methode stellt das Tumorabklatschpräparat eine geeignete Alternative zum Paraffinschnitt dar, wobei seine Vorteile in der schnelleren Präparatherstellung ohne Formalinfixierung, Paraffineinbettung und Schnittanfertigung sowie dem weniger aufwendigen Färbeprotokoll und der Auswertung ganzer Tumorzellkerne in Einzelzelle begründet sind. Allerdings ist beim Tumorabklatschpräparat die Anzahl der anfertigenbaren Präparate und damit durchführbaren Färbungen limitiert und der Asservierungsaufwand deutlich höher als beim Schnittpräparat mit routinemäßiger Aufbewahrung der Paraffinblöcke. Im Vergleich zur IHC weist die FISH eine höhere Sensitivität und Spezifität sowie eine höhere Reproduzierbarkeit auf. Die FISH-Technik erfordert allerdings einen größeren methodischen Aufwand sowie eine spezielle Laborausstattung und Expertise. Zudem ist der Kosten- und Zeitaufwand deutlich höher als bei der IHC.

Der Ergebnisvergleich zwischen FISH und IHC zeigte eine hohe Korrelation (93,3%) zwischen „high level“-amplifizierten und stark positiv (3+) proteinüberexprimierenden Mammakarzinomen. In diesen Fällen bietet die FISH keine zusätzlichen Informationen. Im Falle einer schwach positiven (2+) Überexpression des HER-2/neu-Rezeptorproteins sollte allerdings eine Nachtestung mittels FISH erfolgen, da sonst eine therapierelevante Genamplifikation übersehen werden könnte.

**6. LITERATURVERZEICHNIS**

Allred D.C., Swanson P.E. (2000)

Testing for erbB-2 by immunohistochemistry

Am J Clin Pathol, 113: 171-175

Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. (1998)

Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analyses

Mod Pathol, 11: 155-168

Alroy I., Yarden Y. (1997)

The erbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions

FEBS Lett, 410: 83-86

Andreasen P.A., Kjöllner L., Christensen L., Duffy M.J. (1997)

The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review

Int J Cancer, 72: 1-27

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002)

Krebs in Deutschland

3. Auflage, Robert Koch Institut, Saarbrücken

Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. (1986)

The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein

Nature, 319: 226-234

Barnes D.M., Bartkova J., Camplejohn R.S., Gullick W.J., Smith P.J., Millis R.R.

(1992)

Overexpression of the c-erbB-2 oncogene: Why does this occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance?

Eur J Cancer, 28: 644-648

Bartlett J.M.S., Going J.J., Mallon E.A., Watters A.D., Reeves J.R., Stanton P.,

Richmond J., Donald B., Ferrier R., Cooke T.G. (2001)

Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer

J Pathol, 195: 422-428

Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim Y.M., Mendelsohn J. (1998)

Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor

activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts

Cancer Res, 58: 2825-2831

- Baulida J., Kraus M.H., Alimandi M., Di Fiore P.P., Carpenter G. (1996)  
All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired  
J Biol Chem, 271: 5251-5257
- Becher H., Chang-Claude J. (1996)  
Estimating population-specific disease risks for a given family history with an application to breast cancer  
Genet Epidemiol, 13: 229-242
- Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R., Soper J.T., Dodge R., Clarke-Pearson D.L., Marks P., McKenzie S., Yin S., Bast R.C. Jr. (1990)  
Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer  
Cancer Res, 50: 4087-4091
- Bernoux A., Cremoux P., Laine-Bidron C., Martin E.C., Asselain B., Magdelenat H. (1998)  
Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: Pathological characteristics and clinical outcome. Institut Curie Breast Cancer Study Group  
Breast Cancer Res Treat, 49: 219-225
- Bernstein L., Henderson B.E., Hanisch R., Sullivan-Halley J., Ross R.K. (1994)  
Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women  
J Natl Cancer Inst, 86: 1403-1408
- Bianchi S., Paglierani M., Zampi G., Cardona G., Cataliotti L., Bonardi R., Ciatto S. (1993)  
Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer  
Br J Cancer, 67: 625-627
- Birner P., Oberhuber G., Stani J., Reithofer C., Samonigg H., Hausmaninger H., Kubista E., Kwasny W., Kandioler-Eckersberger D., Gnant M., Jakesz R. (2001)  
Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer  
Clin Cancer Res, 7: 1669-1675
- Brandt P.A., Spiegelmann D., Yaun S.S., Adami H.O., Beeson L., Folsom A.R., Fraser G., Goldbohm R.A., Graham S., Kushi L., Marshall J.R., Miller A.B., Rohan T., Smith-Warner S.A., Speizer F.E., Willett W.C., Wolk A., Hunter D.J. (2000)  
Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight and breast cancer risk  
Am J Epidemiol, 152: 514-527

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

Braun S., Cevatli B.S., Assemi C., Janni W., Kantenich C.R.M., Schindlbeck C., Rjosk D., Hepp F. (2001)  
Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy  
J Clin Oncol, 19: 1468-1475

Buehler H., Bangemann N., Evers H., Becker C., Schaller G. (2000)  
Effective HER-2/neu diagnosis in breast cancer by a combination of immunohistochemistry and FISH  
Proc Am Soc Clin Oncol, 19: 76a (abstract 294)

Busmanis I., Feleppa F., Jones A., McGrath K.M., Reed R., Collins J., Russell I., Begley C.G. (1994)  
Analysis of cerbB2 expression using a panel of six commercially available antibodies  
Pathology, 26: 261-267

Carter C.L., Allen C., Henson D.E. (1989)  
Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases  
Cancer, 63: 181-187

Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B., Henner D., Wong W.L., Rowland A.M., Kotts C., Carver M.E., Shepard H.M. (1992)  
Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for human cancer therapy  
Proc Natl Acad Sci USA, 89: 4285-4289

Chang-Claude J., Becher H., Hamann U., Schroeder-Kurtz T. (1995)  
Risikoabschätzung für das familiäre Auftreten von Brustkrebs  
Zentralblatt f Gynäkologie, 117: 432-434

Chang-Claude J., Eby N., Becher H. (1994)  
Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs  
Zentralblatt f Gynäkologie, 116: 660-669

Ciocca D.R., Fujimura F.K., Tandon A.K., Clark G.M., Mark C., Lee-Chen G.J., Pounds G.W., Vendely P., Owens M.A., Pandian M.R. (1992)  
Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers  
J Natl Cancer Inst, 84: 1279-1282

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996)  
Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data of 53297 women with breast cancer and 100239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies  
Lancet, 347: 1713-1727

Contesso G., Mouriessse H., Freidmann S., Genin J., Sarrazin D., Rouesse J. (1987)  
The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: A study of 1010 patients, uniformly treated at the Institut Gustav-Roussy  
J Clin Oncol, 5: 1378-1386

Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Libermann T.A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A., Ullrich A. (1985)  
Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene  
Science, 230: 1132-1139

Cowen D., Jacquemier J., Houevenaeghel G., Viens P., Puig B., Bardou V.J., Resbeut M., Maraninchi D. (1998)  
Local and distant recurrence after conservative management of "very low-risk" breast cancer are dependent events: A 10-year follow-up  
Int J Radiat Oncol Biol Phys, 41: 801-807

Cremer T., Landegent J., Bruckner A., Scholl H.P., Schardin M., Hager H.D., Devilee P., Pearson P., van der Ploeg M. (1986)  
Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84  
Hum Genet, 74: 346-352

De Potter C.R. (1994)  
The neu oncogene: More than a prognostic indicator?  
Hum Pathol, 25: 1264-1268

Dupont W.D., Parl F.F., Hartmann W.H., Brinton L.A., Winfield A.C., Worrell J.A., Schuyler P.A., Plummer W.D. (1993)  
Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia  
Cancer, 71: 1258-1265

Earp H.S., Dawson T.L., Li X., Yu H. (1995)  
Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: A new signaling paradigm with implications for breast cancer research  
Breast Cancer Res Treat, 35: 115-132

- Easton D.F., Bishop D.T., Ford D., Crockford G.P. (1993)  
Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families  
Am J Hum Genetics, 52: 678-701
- Easton D.F., Ford D., Bishop D.T. (1995)  
Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers  
Am J Hum Genetics, 56: 265-271
- Edorh A., Leroux A., N'sossani B., Parache R.M., Rihn B. (1999)  
Detection by immunohistochemistry of c-erbB2 oncoprotein in breast carcinomas and benign mammary lesions  
Cell Mol Biol, 45: 831-840
- Ellis I.O., Dowsett M., Bartlett J., Walker R., Cooke T., Gullik W., Gusterson B., Mallon E., Lee P.B. (2000)  
Recommendations for HER2 testing in the UK  
J Clin Pathol, 53: 890-892
- Eskelinen M., Lipponen P., Papinaho S., Aaltomaa S., Kosma V.M., Klemi P., Syrjänen K. (1992)  
DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer  
Int J Cancer, 51: 555-561
- Foekens J.A., Smitt M., Van Putten W.L., Peters H.A., Bontenbal M., Jänicke F., Klijn J.G. (1992)  
Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients  
Cancer Res, 52: 6101-6105
- Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. (1994)  
Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium  
Lancet, 343: 692-695
- Friedensreich C., Bryant H.E., Courneya K.S. (2001)  
Case-control study of lifetime physical activity and breast cancer risk  
Am J Epidemiol, 154: 336-347
- Gaedcke J. (2003)  
Bestimmung von Expression und Amplifikation des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 bei Mammakarzinomen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)  
Med. Dissertation, Universität Tübingen

Gerber B., Krause A., Muller H., Richter D., Reimer T., Makovitzky J., Herrnring C., Jeschke U., Kundt G., Friese K. (2001)

Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors  
*J Clin Oncol*, 19: 960-971

Gray J.C., Pinkel D. (1992)

Molecular cytogenetics in human cancer diagnosis  
*Cancer*, 69: 1536-1542

Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B., Manos M.M. (1991)

PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effects of fixative and fixation time  
*Am J Clin Pathol*, 95: 117-124

Grondahl-Hansen J., Hilsenbeck S.G., Christensen I.J., Clark G.M., Osborne C.K., Brunner N. (1997)

Prognostic significance of PAI-1 and uPA in cytosolic extracts obtained from node positive breast cancer patients  
*Breast Cancer Res Treat*, 43: 153-163

Grondahl-Hansen J., Peters H.A., van Putten W.L., Look M.P., Pappot H., Ronne E., Dano K., Kljin J.G., Brunner N., Foekens J.A. (1995)

Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer  
*Clin Cancer Res*, 1: 1079-1087

Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch K.N., Price K.N., Save-Soderborgh J., Anbazhagan R., Styles J., Rudenstam C.M., Golouh R., Reed R., Martinez-Tello F., Tiltman A., Torhorst J., Grigolato P., Bettelheim R., Neville A.M., Bürki K., Castiglione M., Collins J., Lindtner J., Senn H.J. (1992)

Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer  
*J Clin Oncol*, 10: 1049-1056

Hähnel J.R., Woodings T., Vivian A.B. (1979)

Prognostic value of estrogen receptor in primary breast cancer  
*Cancer*, 44: 671-675

Hall J., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C. (1990)

Linkage analysis of early onset familial breast cancer to chromosome 17q-12  
*Science*, 250: 1684-1689

Hanke J., Solinas-Toldo S., Hoheisel J. (1997)

Genomanalyse und Gendiagnostik, 51-91

in: Ganten D., Ruckpaul K.: *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*; 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

- Hanna W. (2001)  
Testing of HER2 status  
*Oncology*, 61 (suppl 2): 22-30
- Harbeck N., Eiermann W., Engel J., Funke I., Lebeau A., Parmanetter W. Untch M. (2001)  
Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom, 39-43  
in: Tumorzentrum München: Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge;  
8. Aufl., Zuckerschwedt, München, Bern, Wien, New York
- Harris J.R., Lippman M.E., Veronesi U., Willett W.E. (1992)  
Breast cancer (First of three parts)  
*N Engl J Med*, 327: 319-328
- Henderson B.E., Ross R.K., Bernstein L. (1988)  
Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture  
*Cancer Res*, 48: 246-253
- Hetzel D.J., Wilson T.O., Kenney G.L., Roche P.C., Cha S.S., Podratz K.C. (1992)  
Her-2/neu expression: A major prognostic factor in endometrial cancer  
*Gynecol Oncol*, 47: 179-185
- Hoang M.P., Sahin A.A., Ordonez N.G., Sneige N. (2000)  
HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma  
*Am J Clin Pathol*, 113: 852-859
- Hsu S., 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
- Huang Z., Hankinson S.E., Colditz G.A., Stampfer M.J., Manson J.E., Hennekens C.H., Rosner B., Speizer F.E., Willett W.C. (1997)  
Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk  
*JAMA*, 278: 1407-1411
- Hudziak R.M., Lewis G.D., Winget M., Fendly B.M., Shepard H.M., Ullrich A. (1989)  
p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor  
*Mol Cell Biol*, 9: 1165-1172

- Hunter D.J., Willet W.C. (1993)  
Diet, body size and breast cancer  
*Epidemiol Rev*, 15: 110-132
- Hynes N.E. (1993)  
Amplification and overexpression of the c-erbB-2 gene in human tumors: Its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor and potential as a target for cancer therapy  
*Semin Cancer Biol*, 4: 19-26
- Hynes N.E., Stern D.F. (1994)  
The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer  
*Biochim Biophys Acta*, 198: 165-184
- Hynes N.E., Gerber H.A., Saurer S., Groner B. (1989)  
Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines  
*J Cell Biochem*, 39: 167-173
- Hyytinen E., Visakorpi T., Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Isola J. (1994)  
Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization  
*Cytometry*, 16: 93-99
- Isola J., Chu L., DeVries S., Matsumura K., Chew K., Ljung B.M., Waldman F.M. (1999)  
Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas  
*Clin Cancer Res*, 5: 4140-4145
- Izumi Y., Xu L., Di Tomaso E., Fukumura D., Jain R.K. (2002)  
Tumor biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail  
*Nature*, 416: 279-280
- Jacobs T.W., Gown A.M., Yaziji H., Barnes M.J., Schnitt S.J. (1999)  
Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer  
*J Clin Oncol*, 17: 1974-1982
- Jacobs T.W., Gown A.M., Yaziji H., Barnes M.J., Schnitt S.J. (2000)  
HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry: A study of interlaboratory agreement  
*Am J Clin Pathol*, 113: 251-258
- Jimenez R.E., Wallis T., Tabaszka O., Visscher D.W. (2000)  
Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: A comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization  
*Mod Pathol*, 13: 37-45

Kakar S., Puangsuwan N., Stevens J.M., Serenas R., Mangan G., Sahai S., Mihalov M.L. (2000)

HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: Comparison of results and correlation with survival  
Mol Diagn, 5: 199-207

Kallioniemi O.P., Holli K., Visakorpi T., Koivula T., Helin H., Isola J. (1991)  
Association of c-erbB-2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer  
Int J Cancer, 49: 650-655

Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Kurisu W., Thor A., Chen L.C., Smith H.S., Waldman F.M., Pinkel D., Gray J.W. (1992)  
ErbB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization  
Proc Natl Acad Sci USA, 89: 5321-5325

Karunagaran D., Tzahar E., Beerli R.R., Chen X., Graus-Porta D., Ratzkin B.J., Seger R., Hynes N.E., Yarden Y. (1996)  
ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: Implications for breast cancer  
EMBO J, 15: 254-264

Kelsey J.L., Bernstein L. (1996)  
Epidemiology and prevention of breast cancer  
Annu Rev Public Health, 17: 47-67

Kern J.A., Schwartz D.A., Nordberg J.E., Weiner D.B., Green M.I., Torney L. (1990)  
p158 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival  
Cancer Res, 50: 5184-5191

Khan A.J., King B.L., Smith B.D., Smith G.L., DiGiovanna M.P., Carter D., Haffty B.G. (2002)  
Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma  
Clin Cancer Res, 8: 540-548

Klapper L.N., Waterman H., Sela M., Yarden Y. (2000)  
Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2  
Cancer Res, 60: 3384-3388

Knight W.A., Livingston R.B., Gregory E.J. (1977)  
Estrogen receptors as independent prognostic factors for early recurrence in breast cancer  
Cancer Res, 37: 4669-4671

Konecny G., Pegram M., Untch M., Thomssen C., Jänicke F., Hepp H., Slamon D.J. (2000)

HER-2/neu als prädiktiver Faktor beim Mammakarzinom

Gebursh Frauenheilk, 60: 609-619

Lebeau A., Deimling D., Kaltz C., Sendelhofert A., Iff A., Luthardt B., Untch M., Löhns U. (2001)

HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization

J Clin Oncol, 19: 354-363

Lehr H.A., Jacobs T.W., Yaziji H., Schnitt S.J., Gown A.M. (2001)

Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis

Am J Clin Pathol, 115: 814-822

Levkowitz G., Waterman H., Zamir E., Kam Z., Oved S., Langdon W.Y., Beguinot L., Geiger B., Yarden Y. (1998)

C-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor

Genes Dev, 12: 3663-3674

Lewis G.D., Figari I., Fendly B., Wong W.L., Carter P., Gorman C., Shepard H.M. (1993)

Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibodies

Cancer Immunol Immunother, 37: 255-263

Leyland-Jones B. (2001)

Maximizing the response to Herceptin® therapy through optimal use and patient selection

Anti-Cancer Drugs, 12 (suppl 4): S11-S17

Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.J. (1988)

Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries

Hum Genet, 80: 224-234

Liu E., Thor A., He M., Barcos M., Ljung B.M., Benz C. (1992)

The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast

Oncogene, 7: 1027-1032

- Löffler G., Wiederanders B. (2003)  
Bioenergetik und Enzymologie, 103-193  
in: Löffler G., Petrides P.E.: Biochemie und Pathobiochemie;  
7. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Lohrlich C., Piccart M. (2001)  
An overview of HER2  
Semin Oncol, 28 (suppl 18): 3-11
- Lovekin C., Ellis I.O., Locker A., Robertson J.F., Bell J., Nicholson R., Gullick W.J.,  
Elston C.W. (1991)  
C-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer  
Br J Cancer, 63: 439-443
- Lupu R., Cardillo M., Harris L., Hijazi M., Rosenberg K. (1995)  
Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression  
and drug resistance  
Sem Cancer Biol, 6: 135-145
- Maia D.M. (1999)  
Immunohistochemical assays for HER2 overexpression  
J Clin Oncol, 17: 1650
- Mass R.D., Sanders C., Charlene K., Johnson L., Everett T., Anderson S. (2000)  
The concordance between the clinical trial assay (CTA) and fluorescence in situ  
hybridization in the Herceptin pivotal trials  
Proc Am Soc Clin Oncol, 19: 75a (abstract 291)
- McCann A.H., Dervan P.A., O'Regan M., Codd M.B., Gullick W.J., Tobin B.M.,  
Carney D.N. (1991)  
Prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer  
Cancer Res, 51: 3296-3303
- McCormick S.R., Lillemoe T.J., Beneke J., Schrauth J., Reinartz J. (2002)  
HER2 assessment by immunohistochemical assays and fluorescence in situ  
hybridization  
Am J Clin Pathol, 117: 935-943
- Meden H., Kuhn W. (1997)  
Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER-2/neu) in ovarian cancer: A new  
prognostic factor  
Eur J Obstet Gynecol Repro Biol, 71: 173-179

Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S.L., Cannon-Albright L., Goldgar R. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1  
*Science*, 266: 66-71

Narod S.A., Feunteun J., Lynch H.T., Watson P., Conway T., Kynch J., Lenoir G.M. (1991)  
Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23  
*Lancet*, 338: 82-83

Onody P., Bertrand F., Muzeau F., Bieche I., Lidereau R. (2001)  
Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical assays for HER-2/neu-status determination: Application to node-negative breast cancer  
*Arch Pathol Lab Med*, 125: 746-750

Padhly L.C., Shih C., Cowing D., Finkelstein R., Weinberg R.A. (1982)  
Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastoma  
*Cell*, 28: 865-871

Palacios J., Benito N., Pizarro A., Limeres M., Suarez A., Cano A., Gamallo C. (1995)  
Relationship between ERBB2 and E-cadherin expression in human breast cancer  
*Virch Arch Int J Pathol*, 427: 259-263

Passarge E. (2001)  
Genetik, 3-54  
in: Siegenthaler W.: *Klinische Pathophysiologie*;  
8. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York 2001

Pasternak K. (1997)  
Monoklonale Antikörpertechnik, 145-194  
in: Ganten D., Ruckpaul K.: *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*;  
1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Pauletti G., Godolphin W., Press M.F., Slamon D.J. (1996)  
Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization  
*Oncogene*, 13: 63-72

- Pauletti G., Dandekar S., Rong H.M., Ramos L., Peng H.J., Seshadri R., Slamon D.J. (2000)  
Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry  
*J Clin Oncol*, 18: 3651-3664
- Pegram M.D., Baly D., Wirth C., Gilkerson E., Slamon DJ., Sliwkowski M.X., Bauer K., Fox J.A. (1997)  
Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity in breast cancer patients in phase III clinical studies of a humanized anti-HER2 antibody  
*Proc Am Assoc Cancer Res*, 38: 602 (abstract 4044)
- Pegram M.D., Pauletti G., Slamon D.J. (1998)  
HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy  
*Breast Cancer Res Treat*, 52: 65-77
- Pegram M.D., Slamon D.J. (2000)  
Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy  
*Semin Oncol*, 27 (suppl 9): 13-19
- Penault-Llorca F., Adelaide J., Houvenaeghel G., Hassoun J., Birnbaum D., Jacquemier J. (1994)  
Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: Impact of fixation  
*J Pathol*, 173: 65-75
- Perez E.A., Roche P.C., Jenkins R.B., Reynolds C.A., Halling K.C., Ingle J.N., Wold L.E. (2002)  
HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation with weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization  
*Mayo Clin Proc*, 77: 148-154
- Persons D.L., Bui M.M., Lowery M.C., Mark H.F., Yung J.F., Birkmeier J.M., Wong E.Y., Yang S.J., Masood S. (2000)  
Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection HER2-neu amplification in breast cancer: A multicenter portability study  
*Ann Clin Lab Sci*, 30: 41-48
- Persons D.L., Borelli K.A., Hsu P.H. (1997)  
Quantitation of HER-2/neu and c-myc gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization  
*Mod Pathol*, 10: 720-727

- Petrides P.E. (2003)  
Gendiagnostik und Genterapie, 331-371  
in: Löffler G., Petrides P.E.: Biochemie und Pathobiochemie;  
7. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2003
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Seagraves R., Lucas J., Gray J.W. (1988)  
Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4  
Proc Natl Acad Sci, 85: 9138-9142
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986)  
Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization  
Proc Natl Acad Sci USA, 83: 2934-2938
- Popescu N.C., King C.R., Kraus M.H. (1989)  
Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32  
Genomics, 4: 362-366
- Press M.F., Pike M.C., Hung G., Zhou J.Y., Ma Y., George J., Dietz-Band J., James W., Slamon D.J. (1994a)  
Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: Correlation with poor prognosis  
Cancer Res, 4: 5675-5682
- Press M.F., Hung G., Godolphin W., Slamon D.J. (1994b)  
Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in the immunohistochemical studies of oncogene expression  
Cancer Res, 54: 2771-2777
- Press M.F., Bernstein L., Thomas P.A., Meisner L.F., Zhou J.Y., Ma Y., Hung G., Robinson R.A., Harris C., El-Naggar A., Slamon D.J., Phillips R.N., Ross J.S., Wolman S.R., Flom K.J. (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
- Press M.F., Pike M.C., Chazin V.R., Hung G., Udove J.A., Markowicz M., Danyluk J., Godolphin W., Sliwkowski M., Akita R., Paterson M.C., Slamon D.J. (1993)  
HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease  
Cancer Res, 53: 4960-4970

- Preston D.L., Plato H., Kopecky K.J., Fujita S. (1987)  
Studies of the mortality of A-bomb survivors  
*Radiat Res*, 111: 151-178
- Ranzani G.N., Pellegata N.S., Previdere C., Saragoni A., Vio A., Maltoni M., Amadori D. (1990)  
Heterogeneous protooncogene amplification correlates with tumor progression and presence of metastases in gastric cancer patients  
*Cancer Res*, 50: 7811-7814
- Revillion F., Bonterre J., Peyrat J.P. (1998)  
ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance  
*Eur J Cancer*, 34: 791-808
- Ridolfi R.L., Jamehdor M.R., Arber J.M. (2000)  
HER-2/neu testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach  
*Mod Pathol*, 13: 866-873
- Rilke F., Colnaghi M.I., Cascinelli N., Andreola S., Baldini M.T., Bufalino R., Della Porta G., Menard S., Pierotti M.A., Testori A. (1991)  
Prognostic significance of Her-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors  
*Int J Cancer*, 49: 44-49
- Roche P.C., Ingle J.N. (1999)  
Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration approved antibody  
*J Clin Oncol*, 17: 434
- Rockhill B., Willett W.C., Hunter D.J., Manson J.E., Hankinson S.E., Colditz B.A. (1999)  
A prospective study of recreational physical activity and breast cancer risk  
*Arch Intern Med*, 159: 2290-2296
- Ross J.S., Fletcher J.A. (1998)  
The HER-2/neu oncogene in breast cancer: Prognostic factor, predictive factor and target for therapy  
*Stem Cells*, 16: 413-428
- Ross J.S., Fletcher J.A. (1999)  
HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer  
*Am J Clin Pathol*, 112 (suppl 1): S53-S67

- Ross R.K., Paganini-Hill A., Wan P.C., Pike M.C. (2000)  
Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: Estrogen versus estrogen plus progestin  
J Natl Cancer Inst, 92: 328-332
- Saffari B., Jones L.A., El-Naggar A., Felix J.C., George J., Press M.F. (1995)  
Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB-2) in endometrial cancers: Correlation with overall survival  
Cancer Res, 55: 5693-5698
- Schaller G., Untch M. (2002)  
Humanisierte Antikörper in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms. State of the Art 2000, 190-194  
in: von Minckwitz G.: Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome;  
Zuckerschwedt, München, Wien, New York
- Schaller G., Bangemann N., Becker C., Bühler H., Opri F., Weitzel H.K. (1999)  
Therapy of metastatic breast cancer with humanized antibodies against the HER2 receptor protein  
J Cancer Res Clin Oncol, 125: 520-524
- Schatzkin A., Longecker M.P. (1994)  
Alcohol and breast cancer  
Cancer, 74: 1101-1110
- Seshadri R., Firgaira F.A., Horsfall D.J., McCaul K., Setlur V., Kitchen P. (1993)  
Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group  
J Clin Oncol, 11: 1936-1942
- Shak S. (1999)  
Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group  
Semin Oncol, 6: 71-77
- Shepard H.M., Lewis G.D., Sarup J.C., Fendly B.M., Maneval D., Mordenti J., Figari I., Kotts C.E., Palladino M.A. Jr., Ullrich A., Slamon D. (1991)  
Monoclonal antibody therapy of human cancer: Taking the HER2 protooncogene to the clinic  
J Clin Immunol, 11: 117-127

- Siiteri P.K., Hammond G.L., Nisker J.A. (1981)  
Increased availability of serum estrogens in breast cancer: A new hypothesis, 87-101  
in: Pike MC, Siiteri PK, Welsch CW: Hormones and Breast Cancer;  
Cold Spring Harbour, New York
- Slamon D.J., Pegram M.D. (2001)  
Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials  
Semin Oncol, 28 (suppl 3): 13-19
- Slamon D.J., Clark M. (1988)  
Amplification of c-erbB-2 and aggressive breast tumors?  
Science, 240: 1795-1798
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. (1987)  
Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the  
HER-2/neu oncogene  
Science, 235: 177-182
- Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J.,  
Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., Press M. (1989a)  
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer  
Science, 244: 707-712
- Slamon D.J., Press M.F., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Stuart S.G., Ullrich A.  
(1989b)  
The HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer  
Cancer Cells, 7: 371-380
- Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming  
T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. (2001)  
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast  
cancer that overexpress HER2  
N Engl J Med, 344: 783-792
- Sliwkowski M.X., Lofgren J.A., Lewis G.D., Hotaling T.E., Fendly B.M., Fox J.A.  
(1999)  
Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)  
Semin Oncol, 26 (suppl 12): 60-70
- Starr A., Bloom K., Oleske D., Cobleigh M.A. (2000)  
Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry  
(IHC) in determining HER-2/neu status in breast cancer patients  
Proc Am Soc Clin Oncol, 19: 662a (abstract 2610)

- Tanner M., Gancberg D., DiLeo A., Larsimont D., Rouas G., Piccart M.J., Isola J. (2000)  
Chromogenic in situ hybridization: A practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples  
Am J Pathol, 157: 1467-1472
- Thune I., Brenn T., Lund E., Gaard M. (1997)  
Physical activity and the risk of breast cancer  
N Engl J Med, 336: 1269-1275
- Toikkanen S., Helin H., Isola J., Joensuu H. (1992)  
Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30-year follow-up  
J Clin Oncol, 10: 1044-1048
- Tsuda H., Akiyama F., Terasaki H., Hasegawa T., Kurosumi M., Shimadzu M., Yamamori S., Sakamoto G. (2001)  
Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma  
Cancer, 92: 2965-2974
- Tubbs R.R., Pettay J.D., Roche P.C., Stoler M.H., Jenkins R.B., Grogan T.M. (2001)  
Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: Apparent immunohistochemical false-positives do not get the message  
J Clin Oncol, 19: 2714-2721
- Vogel C., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., Stewart S.J. (2001)  
First-line, single-agent Herceptin (trastuzumab) in metastatic breast cancer. A preliminary report  
Eur J Cancer, 37 (suppl 1): S25-S29
- Wang S., Saboorian M.H., Frenkel E., Hynan L., Gokaslan S.T., Ashfaq R. (2000)  
Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays  
J Clin Pathol, 53: 374-381
- Wang S., Saboorian M.H., Frenkel E.P., Haley B.B., Siddiqui M.T., Gokaslan S., Hynan L., Ashfaq R. (2002)  
Aneusomy 17 in breast cancer: Its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status  
Mod Pathol, 15: 137-145

Wilcox-Honnold P.M. (1998)

Breast cancer and gene testing. Risk, rationale and responsibilities of primary care providers

Lippincotts Prim Care Pract, 2: 271-283

Willett W.C., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rosner B.A., Hennekens C.H., Speizer F.E. (1987)

Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer

N Engl J Med, 316: 1174-1180

Winstanley J., Cooke T., Murray G.D., Platt-Higgins A., George W.D., Halt S., Myscov M., Spedding A., Barraclough B.R., Rudland P.S. (1991)

The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer

Br J Cancer, 63: 447-450

Wooster R., Neuhausen S.L., Mangion J., Quirk Y., Ford D., Collins N., Nguyeb K., Seal S., Tran T., Averill D., Fields P., Marshall G., Narod S., Lenoir G.M., Lynch H., Feunteun J., Devilee P., Cornelisse C.J., Menko F.H., Daly P.A., Ormiston W., McManus R., Pye C., Lewis C.M., Cannon-Albright L.A., Peto J., Ponder B.A.J., Skolnick M.H., Easton D.F., Goldgar D.E., Stratton M.R. (1994)

Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13  
Science, 265: 2088-2090

## **7. ANHANG**

### **7.1 Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
BRCA	Brustkrebsgen (breast cancer gene)
°C	Grad Celcius
CEP	Chromosome enumeration DNA probe
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
F(ab)	Antigenbindendes Fragment (fragment antigen binding)
Fc	kristallines Fragment (fragment crystalline)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (human epidermal growth factor receptor)
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSI	Locus specific identifier
M	Molar (Mol/Liter)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter

---

n	Anzahl unabhängiger Versuche
ng	Nanogramm
NP	Nonylphenyl-polyethylenglycol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (Potentia hydrogenii)
PR	Progesteronrezeptor
RT	Reverse Transkriptase
SSC	Natriumchlorid / Natriumcitrat (standard saline citrate)
Tab.	Tabelle
ZK	Zellkern

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

	Seite
<b>Abb. 1</b> HER-2/neu-Status: Genamplifikation und Proteinüberexpression	8
<b>Abb. 2</b> HER-2/neu-Testalgorithmus	12
<b>Abb. 3</b> Prinzip der FISH-Technik	21
<b>Abb. 4</b> Beispiele und Richtlinien zum Auszählen der HER-2/neu-Sondensignale	27
<b>Abb. 5</b> Avidin-Biotin-Komplex-Methode	30
<b>Abb. 6</b> Verteilung der HER-2/CEP17-Ratio unter den nicht-amplifizierten und amplifizierten Fällen	34
<b>Abb. 7</b> Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern unter den nicht-amplifizierten und amplifizierten Fällen	36
<b>Abb. 8</b> HER-2/neu-Genstatus in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen	39
<b>Abb. 9</b> HER-2/neu-Genstatus mit Verteilung der durchschnittlichen HER-2/neu-Genkopienzahl sowie der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl <b>A:</b> bei einem HercepTest-Score von 0 <b>B:</b> bei einem HercepTest-Score von 1+ <b>C:</b> bei einem HercepTest-Score von 2+ <b>D:</b> bei einem HercepTest-Score von 3+	43 45 46 48
<b>Abb. 10</b> Verteilung der durchschnittlichen Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern unter den nicht-polyploiden und polyploiden Fällen	50

### 7.3 Tabellenverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1</b> Patientinnenalter und histopathologische Merkmale der untersuchten Mammakarzinome	15
<b>Tab. 2</b> Auswertung der Fluoreszenzsignale	28
<b>Tab. 3</b> Immunhistochemischer Nachweis des HER-2/neu-Rezeptorproteins	32
<b>Tab. 4</b> Dako HercepTest-Score zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung beim Nachweis von HER-2/neu	32
<b>Tab. 5</b> FISH-Ergebnisse: HER-2/CEP17-Ratio	34
<b>Tab. 6</b> FISH-Ergebnisse: Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl	35
<b>Tab. 7</b> Vergleich: HER-2/CEP17-Ratio ↔ durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl	37
<b>Tab. 8</b> Vergleich der HER-2/CEP17-Ratio bei unterschiedlicher Anzahl der ausgewerteten Tumorzellkerne	38
<b>Tab. 9</b> IHC-Ergebnisse: Dako-HercepTest-Score	40
<b>Tab. 10</b> Vergleich: HercepTest-Score ↔ HER-2/CEP17-Ratio	41
<b>Tab. 11</b> Vergleich: HercepTest-Score ↔ durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern	42
<b>Tab. 12</b> Polyploidie und HER-2/neu-Status	50

### 7.4 Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse und der histopathologischen Tumormerkmale aller 150 untersuchten Mammakarzinome, geordnet nach dem immunhistochemischen HercepTest-Score

#### Mammakarzinome mit einem HercepTest von 3+

Fall	Alter	Histologie	Grading	Staging			Steroidhormone		Ratio	HER-2/neu-Gen		Chromosom 17		Häufigste Kombination(en)
				T	N	M	ER	PR		HER-2/ZK	min-max	CEP17/ZK	min-max	
1	79	IDC	G2	pT2	pN1bii	M0	ER -	PR +	1,1	3,4	2-7	3,1	2-6	3/3
2	67	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	<b>3,0</b>	<b>10,6</b>	6-23	3,5	2-5	11-15/4
3	46	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	<b>3,1</b>	<b>16,7</b>	5-27	5,4	1-8	16-20/6
4	55	ILC	G2	pT2	pN1bi	M0	ER +	PR -	<b>3,5</b>	<b>13,0</b>	6-29	3,7	2-6	11-15/3, 11-15/4
5	61	IDC	G3	pT2	pN1bi	M0	ER -	PR -	<b>3,8</b>	<b>14,7</b>	10-23	3,9	3-6	11-15/4
6	34	ILC	G2	pT1b	pNx	M1	ER +	PR +	<b>4,5</b>	<b>11,4</b>	5-16	2,5	1-4	11-15/3
7	80	IDC	G2	pT2	pN1bii	M0	ER +	PR -	<b>5,0</b>	<b>14,6</b>	6-29	3,0	1-5	11-15/3, 16-20/4
8	70	IDC	G3	pT1mik	pN1biii	pMx	ER -	PR -	<b>5,4</b>	<b>21,0</b>	7-33	3,9	1-6	21-30/4
9	79	IDC	G2	pT2	pN0	pM0	ER +	PR +	<b>5,6</b>	<b>11,1</b>	7-15	2,0	1-3	11-15/2
10	65	IMeC	G3	pT1c	pN0	pM0	ER +	PR -	<b>5,8</b>	<b>15,7</b>	10-24	2,7	2-3	16-20/3
11	50	IDC	G3	ypT1a	ypN0	yM0	ER +	PR -	<b>6,3</b>	<b>15,1</b>	7-23	2,4	1-4	11-15/2
12	51	IDLC	G3	pT2	pN1biii	pM0	ER +	PR -	<b>6,7</b>	<b>28,1</b>	19-41	4,2	3-6	21-30/4
13	63	IDC	G2	pT2	pN1bi	M0	ER +	PR +	<b>6,8</b>	<b>23,4</b>	14-35	3,4	2-4	21-30/3, 21-30/4
14	60	IDC	G2	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	<b>8,6</b>	<b>18,5</b>	8-36	2,1	1-4	16-20/2
15	50	IDC	G3	pT1a	pN0	M0	ER -	PR -	<b>9,3</b>	<b>12,9</b>	7-28	1,4	1-2	11-15/1, 11-15/2

#### Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+ - 3+

Fall	Alter	Histologie	Grading	Staging			Steroidhormone		Ratio	HER-2/neu-Gen		Chromosom 17		Häufigste Kombination(en)
				T	N	M	ER	PR		HER-2/ZK	min-max	CEP17/ZK	min-max	
1	61	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,6	<b>4,3</b>	2-8	2,8	2-5	4/2

## Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 2+

Fall	Alter <sup>1</sup>	Histologie <sup>2</sup>	Grading	Staging			Steroidhormone		Ratio	HER-2/neu-Gen		Chromosom 17		Häufigste Kombination(en) <sup>6</sup>
				T	N	M	ER +	PR +		HER-2/ZK <sup>3</sup>	min-max <sup>5</sup>	CEP17/ZK <sup>4</sup>	min-max <sup>5</sup>	
1	64	IDLC	G2	pT1c	pN0	pMx	ER +	PR +	1,0	2,3	1-4	2,2	1-4	2/2
2	61	IDC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	3,1	2-4	3,2	2-4	4/4
3	53	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,2	1-4	2,1	1-4	2/2
4	67	IDC	G2	pT2	pN1bi	pMx	ER +	PR +	1,0	2,0	1-3	2,0	1-3	2/2
5	54	ILC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,0	1-4	2,0	1-4	2/2
6	66	IDC	G2	pT1b	pN0	pMx	ER +	PR +	1,1	3,7	2-5	3,5	2-4	4/4
7	47	ILC	G2	pT2	pN1biii	pMx	ER +	PR +	1,1	2,2	1-4	2,0	1-2	2/2
8	74	ILC	G3	pT2	pN0	M0	ER +	PR -	1,1	2,0	1-4	1,9	1-4	2/2
9	44	IDC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	3,6	2-5	3,3	2-4	4/4
10	70	IMuC	G1	pT2	pN0	pM0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-3	1,8	1-2	2/2
11	62	IDC / R	--	--	--	--	ER +	PR +	1,1	2,0	2-3	1,9	1-2	2/2
12	66	IMuC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,5	1-4	2,3	1-4	2/2
13	58	IDC	G3	pT2	pN1biii	pM0	ER -	PR -	1,1	2,4	2-4	2,2	1-3	2/2
14	47	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,5	1-4	2,3	1-4	2/2
15	60	IDLC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,2	1-4	2,0	1-3	2/2
16	64	IDC	G3	pT2	pN1bi	M0	ER -	PR +	1,2	3,5	2-9	3,0	1-5	2/2, 4/3, 4/4
17	57	IDC	G2	pT2	pN1a	M0	ER +	PR +	1,2	3,2	2-6	2,8	2-3	3/3, 4/3
18	71	ICIC	G2	pT2	pN0	pMx	ER +	PR -	1,3	<b>5,0</b>	3-7	3,8	2-4	4/4, 5/4, 6/4
19	61	IDC	G2	pT1b	pN0	pMx	ER +	PR +	1,3	<b>4,5</b>	2-6	3,3	1-5	5/4
20	50	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,3	3,4	1-6	2,6	2-4	2/2, 4/3
21	55	IDC	G3	pT1c	pN1bii	M0	ER -	PR +	1,3	3,0	1-5	2,2	1-4	3/2
22	27	IDC / IMuC	G2	pT2	pN1bi	pMx	ER +	PR +	1,3	2,6	1-5	2,1	1-4	3/2
23	44	IMeC	G3	pT2	pN0	M0	ER -	PR -	1,4	2,1	1-4	1,5	1-3	2/1, 2/2
24	55	IDC	G2	pT4	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,4	<b>5,4</b>	2-8	3,9	2-6	5/4, 6/4
25	65	ICIC	G2	pT1c	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,4	<b>6,7</b>	4-9	4,9	2-7	7/5
26	56	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR -	1,4	<b>5,4</b>	2-20	3,9	1-14	4/3

27	62	IDC	G2	pT1c	pN0	pM0	ER +	PR +	1,5	3,0	2-5	2,1	1-4	3/2
28	80	IDLC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
29	61	IDLC	G3	pT1c	pN1bii	M0	ER +	PR -	--	--	--	--	--	--
30	41	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--

### Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 1+

Fall	Alter <sup>1</sup>	Histologie <sup>2</sup>	Grading	Staging			Steroidhormone		Ratio	HER-2/neu-Gen		Chromosom 17		Häufigste Kombination(en) <sup>6</sup>
				T	N	M	ER	PR		HER-2/ZK <sup>3</sup>	min-max <sup>5</sup>	CEP17/ZK <sup>4</sup>	min-max <sup>5</sup>	
1	54	IDC / R	--	--	--	--	ER -	PR -	0,7	2,5	2-4	3,5	2-4	2/3, 2/4
2	41	IDC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR +	0,8	2,1	1-4	2,7	1-3	2/3
3	70	IDC	G3	pT2	pN1biii	pM0	ER +	PR +	0,9	2,6	1-5	2,8	1-5	2/2
4	49	ILC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,0	1-3	1,9	1-3	2/2
5	54	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	1,9	1-2	1,9	1-2	2/2
6	59	IDC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER -	PR -	1,0	3,6	2-7	3,5	2-5	3/3, 4/4
7	42	IDC	G2	pT2	pN0	pMx	ER +	PR -	1,0	3,0	2-5	2,9	1-5	2/2, 3/3, 4/4
8	46	IDC	G2	pT1c	pN0	pMx	ER +	PR +	1,0	2,2	2-4	2,2	1-4	2/2
9	63	IDC	G2	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,0	1,9	1-3	1,9	1-2	2/2
10	41	IDC	G2	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,0	2,2	1-4	2,2	1-4	2/2
11	46	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,0	1-3	2,0	1-4	2/2
12	57	IDC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR -	1,0	1,9	1-3	1,9	1-2	2/2
13	35	IDC	G2	ypT3	ypN1bi	yM0	ER -	PR -	1,0	2,0	1-3	1,9	1-2	2/2
14	54	IDLC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,0	2,7	2-4	2,7	2-4	2/2
15	68	IDLC	G1	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,0	1-4	1,9	1-2	2/2
16	63	IDC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	1,9	1-5	1,9	1-3	2/2
17	58	IDC	G2	pT1b	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	2,2	2-4	2,0	1-4	2/2
18	50	IDC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	2,8	2-4	2,5	1-4	2/2
19	38	ILC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	2,1	2-4	1,9	1-3	2/2
20	76	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER -	PR -	1,1	2,8	2-4	2,6	1-3	3/3

21	58	IDC	G2	pT1c	pN0	pM0	ER -	PR +	1,1	2,0	1-3	1,8	1-3	2/2
22	32	IMeC	G3	pT2	pN0	pM0	ER -	PR -	1,1	1,3	1-2	1,2	1-2	1/1
23	32	IDC	G2	pT1c	pN1a	pM0	ER +	PR +	1,1	1,3	1-3	1,2	1-2	1/1
24	76	IDC	G3	pT2	pN0	M1	ER +	PR +	1,1	<b>4,1</b>	2-5	3,8	1-5	4/4
25	54	IDC	G3	pT2	pN0	M0	ER -	PR -	1,1	3,5	2-6	3,2	2-5	3/3, 4/3, 4/4
26	41	IDC	G2	pT3	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-4	1,9	1-2	2/2
27	41	IDLC	G3	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,1	2,3	1-5	2,0	1-4	2/2
28	71	ILC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,1	1-4	1,9	1-4	2/2
29	46	IDLC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-4	1,9	1-4	2/2
30	50	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-3	1,9	1-3	2/2
31	65	IDLC	G2	pT2	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	<b>4,2</b>	3-5	3,9	3-5	4/4
32	42	IDC	G3	pT2	pN1bi	M0	ER +	PR -	1,1	1,1	1-2	1,1	1-2	1/1
33	58	IDC	G2	pT1c	pN1biv	M0	ER -	PR -	1,2	2,5	2-4	2,0	2	2/2, 3/2
34	51	ILC	G2	ypT1c	ypN1bi	ypM1	ER +	PR +	1,2	2,2	1-5	1,9	1-3	2/2
35	72	IDLC	G2	pT2	pN0	pM0	ER +	PR +	1,2	3,5	2-7	3,0	2-5	3/3 , 4/3
36	73	IDC	G3	pT3	pN2	pMx	ER +	PR +	1,3	3,7	2-4	2,8	2-4	4/3
37	35	IMeC	G3	pT2	pN0	M0	ER -	PR -	1,3	2,6	1-6	2,1	1-4	2/2
38	38	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,3	2,3	1-4	1,8	1-2	2/2
39	67	IDC	G3	pT1c	pN1bi	pMx	ER -	PR -	1,3	2,2	1-4	1,7	1-4	2/1, 2/2
40	63	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,9	3,9	1-8	2,1	1-4	4/2
41	64	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,9	<b>4,4</b>	1-8	2,4	1-4	3/2
42	62	ILC	G2	pT1c	pN1bii	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
43	50	IDC	G2	pT1c	pN1biii	M0	ER -	PR -	--	--	--	--	--	--
44	65	IDC	G3	ypT3	ypN1biii	yM0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
45	51	IDLC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--

## Mammakarzinome mit einem HercepTest-Score von 0

Fall	Alter <sup>1</sup>	Histologie <sup>2</sup>	Grading	Staging			Steroidhormone		Ratio	HER-2/neu-Gen		Chromosom 17		Häufigste Kombination(en) <sup>6</sup>
				T	N	M	ER +	PR +		HER-2/ZK <sup>3</sup>	min-max <sup>5</sup>	CEP17/ZK <sup>4</sup>	min-max <sup>5</sup>	
1	51	IDC	G2	ypT4	ypN2	ypM1	ER +	PR +	0,7	2,0	2	2,7	2-4	2/3
2	61	ILC	G2	pT2	pN1bi	M0	ER +	PR +	0,7	1,6	1-2	2,3	2-3	2/2
3	39	IDC	G3	pT2	pN1biii	M0	ER -	PR -	0,8	2,2	1-4	2,6	2-4	2/2
4	61	ILC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER -	PR +	0,8	1,6	1-3	1,9	1-2	1/2, 2/2
5	78	IDC / IMuC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	0,9	3,2	2-4	3,4	1-5	3/4, 4/4
6	63	ILC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR -	0,9	1,8	1-3	2,0	1-3	2/2
7	52	ILC	G3	pT3	pNx	M1	ER +	PR +	0,9	1,8	1-4	2,0	1-3	2/2
8	46	IDC	G2	pT1c	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,0	2,3	2-6	2,3	1-5	2/2
9	52	IDC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,0	1,7	1-4	1,7	1-4	1/1, 2/2
10	58	ILC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,1	1-6	2,0	1-5	2/2
11	30	IDC / R	--	--	--	--	ER +	PR +	1,0	1,9	1-3	1,9	1-2	2/2
12	75	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR -	1,0	1,3	1-3	1,2	1-2	1/1
13	72	IDLC	G3	ypT4	ypN1biii	ypM1	ER +	PR +	1,0	2,1	1-4	2,0	1-4	2/2
14	61	IDC	G2	pT2	pN1biii	pM0	ER +	PR +	1,0	2,2	1-5	2,2	1-4	2/2
15	50	ILC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	1,9	1-2	1,9	1-2	2/2
16	52	ILC	G2	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,0	1,9	1-4	1,9	1-4	2/2
17	43	ILC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	3,3	2-5	3,3	1-4	4/4
18	41	ILC	G2	pT1b	pNx	M0	ER +	PR +	1,0	2,0	1-4	2,1	1-4	2/2
19	63	ILC	G2	pT1b	pN0	M0	ER +	PR -	1,0	1,9	1-3	1,8	1-2	2/2
20	59	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR -	1,0	2,0	1-4	2,1	1-4	2/2
21	31	IDC	G2	pT2	pN1a	M0	ER +	PR +	1,0	3,6	2-5	3,5	2-4	4/4
22	70	IDLC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR -	1,0	2,0	1-4	2,0	1-4	2/2
23	43	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER -	PR -	1,0	2,2	1-5	2,1	1-5	2/2
24	60	ILC	G2	pT2	pN1bi	pMx	ER +	PR +	1,0	1,8	1-3	1,9	1-4	2/2
25	78	IDC	G2	pT2	pN1biii	pMx	ER +	PR -	1,0	1,9	1-3	1,9	1-2	2/2
26	62	IDLC	G3	pT3	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,0	3,7	2-6	3,5	2-5	3/3, 4/4

27	50	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	2,6	1-5	2,5	1-5	2/2
28	72	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,0	<b>4,3</b>	2-6	4,1	2-6	4/4, 5/5
29	58	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER -	PR -	1,0	2,0	1-3	2,0	1-3	2/2
30	61	IDLC	G2	pT2	pN1bii	M0	ER +	PR +	1,0	2,9	2-4	2,8	2-4	3/3
31	47	IDC	G3	pT4b	pN2	M0	ER +	PR +	1,1	<b>4,6</b>	3-7	4,1	2-7	3/3
32	76	ILC	G2	pT1c	pN0	pMx	ER -	PR +	1,1	2,1	1-4	1,9	1-4	2/2
33	54	ILC	G2	pT2	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,1	2,2	1-4	2,0	1-4	2/2
34	40	IMuC	G1	pT1a	pNx	pMx	ER +	PR +	1,1	2,1	1-4	1,9	1-3	2/2
35	47	IDC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER -	PR -	1,1	1,8	1-3	1,7	1-3	2/2
36	62	IDC	G2	pT1c	pN0	pM0	ER +	PR +	1,1	2,9	2-6	2,5	1-4	3/3
37	70	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	<b>4,1</b>	2-6	3,6	2-5	4/4
38	52	ILC	G2	pT3	pN1bi	pM0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-3	1,9	1-2	2/2
39	63	IDC	G3	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	3,3	1-6	3,1	1-6	3/3
40	77	IDC	G2	pT1c	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-3	1,9	1-2	2/2
41	49	IDC	G2	ypT2	ypN1bii	yM0	ER +	PR -	1,1	3,3	2-5	3,1	1-4	3/3 , 4/4
42	74	IDC / IMuC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,2	1-4	1,9	1-4	2/2
43	60	IDLC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,5	1-4	2,4	1-4	2/2
44	58	IDC	G2	pT1c	pN1bi	M0	ER +	PR +	1,1	2,1	2-4	2,0	1-4	2/2
45	40	IDC / R	--	--	--	--	ER +	PR +	1,1	3,0	2-6	2,8	1-5	3/3
46	72	IDLC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,1	2,0	1-3	1,9	1-3	2/2
47	44	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	1,2	2,3	2-4	2,0	1-4	2/2
48	59	IDC	G3	pT1c	pN0	M0	ER +	PR -	1,3	2,4	1-4	1,9	1-3	2/2, 3/2
49	38	IDLC	G2	pT1c	pN1biii	M0	ER +	PR +	1,7	1,9	1-4	1,1	1-2	2/1
50	68	IDC	G3	pT2	pN1biv	M0	ER -	PR -	--	--	--	--	--	--
51	60	IDC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
52	75	ILC	G2	pT2	pN0	pM0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
53	38	IMeC	G3	pT1c	pN0	pMx	ER -	PR -	--	--	--	--	--	--
54	42	IDLC	G3	pT2	pN1biii	M0	ER -	PR -	--	--	--	--	--	--
55	68	IDLC	G2	pT2	pN1bii	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--

56	41	ILC	G2	pT1c	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
57	48	IDC	G2	pT2	pN0	M0	ER +	PR +	--	--	--	--	--	--
58	75	ILC	G2	ypT3	ypN1biv	yM0	ER +	PR -	--	--	--	--	--	--
59	62	IDC	G3	ypT2	ypN0	yM0	ER -	PR -	--	--	--	--	--	--

<sup>1</sup>**Alter:** Alter der Patientin zum Operationszeitpunkt.

<sup>2</sup>**Histologie:** **IDC:** invasives duktales Karzinom; **ILC:** invasives lobuläres Karzinom; **IDLC:** invasives duktulo-lobuläres Karzinom; **ICIC:** invasives Klarzellkarzinom; **IMeC:** invasives medulläres Karzinom; **IMuC:** invasives muzinöses Karzinom.

<sup>3</sup>**HER-2/ZK:** Durchschnittliche HER-2/neu-Genkopienzahl pro Tumorzellkern.

<sup>4</sup>**CEP17/ZK:** Durchschnittliche Chromosom 17-Zahl pro Tumorzellkern.

<sup>5</sup>**min-max:** Minimale bis maximale Signalanzahl pro Tumorzellkern im untersuchten Mammakarzinom.

<sup>6</sup>**Häufigste Signalkombination(en):** Häufigste HER-2/CEP17-Signalkombination(en) im untersuchten Mammakarzinom.

## DANKSAGUNG

Ich danke **Herrn Prof. Dr. med. D. Wallwiener** für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die Vertretung vor der Fakultät.

Bei **Herrn Dr. med. R. Emig** bedanke ich mich für die zuverlässige Betreuung dieser Doktorarbeit, für seine Anregungen und seine aufmunternde Unterstützung sowie seine permanente Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. med. U. Vogel** aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine große Geduld sowie für die Mitgestaltung und Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke **Frau cand. med. Regine Arnold** für die erfolgreiche Zusammenarbeit sowie für ihre Zuverlässigkeit, Unterstützung und Freundschaft.

Bei **Herrn Dr. rer. nat. M. Zwirner** und seinem **Team** bedanke ich mich für sie bereitwillige Unterstützung im Labor.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der **Abteilung für Pathologie** in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, besonders an **Frau H. Böhner** und **Frau G. Wroblewski**, für die Herstellung der Tumorabklatschpräparate.

**Bastian Pristl** danke ich für seine geduldige Hilfe bei der Erstellung der Grafiken dieser Arbeit.

Mein Dank gilt schließlich **meinen Eltern** für die Ermöglichung des Studiums sowie die Begleitung und Hilfe vom Beginn bis zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten**

Name: Sina Herzog  
Geburtsdatum: 29.11.1978  
Geburtsort: Ludwigsburg

### **Schulbildung**

1985-1989 Grundschule in Freiberg (Grünlandschule)  
1989-1998 Gymnasium in Freiberg (Oscar-Paret-Schule)  
26.06.1998 Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung**

16.10.1998 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Eberhardt-Karls-  
Universität Tübingen  
28.08.2000 Physikum  
28.08.2001 Erstes Staatsexamen  
31.03.2004 Zweites Staatsexamen  
2004-2005 Praktisches Jahr am Katharinenhospital Stuttgart  
11.05.2005 Drittes Staatsexamen