

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Amplifikation und Expression von HER2
beim
Adenokarzinom des Ösophagus**

Dissertation
zur Erlangung eines Grades
des Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Vorgelegt von

Franziska Stern
2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. S.E. Baldus

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG	6
1.1 EINLEITENDE BETRACHTUNGEN	6
1.2 DAS ADENOKARZINOM DES ÖSOPHAGUS	7
1.2.1 <i>Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese</i>	7
1.2.2 <i>Lokalisation & Metastasierung</i>	9
1.2.3 <i>Klinik</i>	10
1.2.4 <i>Diagnostik</i>	10
1.2.5 <i>Pathomorphologie</i>	12
1.2.6 <i>Molekulare Basis</i>	13
1.2.7 <i>Therapie</i>	14
1.2.7.1 <i>Chirurgische Therapie</i>	15
1.2.7.2 <i>Multimodale Therapiekonzepte</i>	16
1.2.8 <i>Prognose</i>	16
1.3 HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2	17
1.3.1 <i>Entdeckung und Struktur</i>	17
1.3.2 <i>Funktion</i>	19
1.3.3 <i>Liganden und Bindungsmechanismen</i>	20
1.3.4 <i>Besonderheiten des HER2-Rezeptors</i>	20
1.3.5 <i>HER2-Expression in adulten und fetalen Geweben</i>	23
1.3.6 <i>Bedeutung in der Karzinogenese</i>	23
1.3.7 <i>HER2 beim Adenokarzinom des Ösophagus</i>	24
1.3.8 <i>Therapeutische Bedeutung von HER2</i>	25
1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	25
2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN	26
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV	26
2.2 MATERIALIEN	27
2.2.1 <i>Geräte und Chemikalien</i>	27
2.2.2 <i>Gewebe</i>	30
2.3 METHODEN	31
2.3.1 <i>Hämatoxylin - Eosin – Färbung (H&E Färbung)</i>	31
2.3.2 <i>Immunhistochemische Färbung mit A0485</i>	31
2.3.2.1 <i>Auswertung</i>	32
2.3.3 <i>Immunhistochemische Färbung mit TAB250</i>	33
2.3.3.1 <i>Auswertung</i>	34
2.3.4 <i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)</i>	34
2.3.4.1 <i>Auswertung</i>	35
2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
3. ERGEBNISSE	37
3.1 FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	37
3.1.1 <i>Durchschnittliche HER2-Signalanzahl</i>	37
3.1.2 <i>Durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl</i>	38
3.1.3 <i>HER2-Genamplifikation in Bezug auf die HER2-Ratio</i>	39

Inhaltsverzeichnis

3.1.4. HER2-Genamplifikation in Bezug auf Chromosom 17 Aneusomie .	41
3.1.5. Vergleich HER2-Genkopienzahl vs. HER2/Chromosom 17-Ratio ...	43
3.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.....	44
3.2.1 Vergleichende Analyse von A0485 und TAB250	45
3.3 KORRELATION VON HER2-GENAMPLIFIKATION UND P185-ÜBEREXPRESSION	46
3.4 KORRELATION VON HER2-GENAMPLIFIKATION UND P185-ÜBEREXPRESSION	48
MIT HISTOPATHOLOGISCHEN PARAMETERN.....	48
3.4.1 HER2-Genamplifikation	48
3.4.2 Überexpression des Genproduktes p185.....	49
3.4.2.1 Polyklonaler Antikörper A0485.....	49
3.4.2.2 Monoklonaler Antikörper TAB250	50
4. DISKUSSION	52
4.1 HER2-AMPLIFIKATION BEIM ADENOKARZINOM DES ÖSOPHAGUS.....	52
4.2 P185-ÜBEREXPRESSION BEIM ADENOKARZINOM DES ÖSOPHAGUS	56
4.3 KORRELATION DES HER2-STATUS MIT KLINISCH-PATHOLOGISCHEN	59
PARAMETERN.....	59
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	65
6. LEBENSLAUF	83
7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	85
8. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	87
9. DANKSAGUNG	88
10. ZUSAMMENFASSUNG	90

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AG	Arbeitsgruppe
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöses-Polyposis-Coli-Gen
AS	Aminosäuren
BE	Barrettösophagus
BK	Brustkrebs
CA 19-9	Carbohydrat Antigen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
DCC	Deleted-in-Colon-Carcinoma-Gen
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	et alii
FDA	Federal Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GERD	Gastroösophageale Refluxerkrankung
GRB	Growth factor receptor-bound protein
HGD	High grade dysplasie
JÜR	Jahresüberlebensrate
LGD	Low grade dysplasie
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of heterozygosity = Verlust von Allelen eines Chromosoms
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mon.	Monate
NRG	Neureguline
OT	Objektträger
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase-C γ
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
Rb	Retinoblastom-Gen

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
second messenger	Substrat innerhalb der Signalkaskade der Zelle
SH2	SRC-Homologieeinheit
SRC	Onkogen des Rous-Sarcom-Virus

Die Symbole physikalischer und chemischer Größen bzw. ihre Einheiten und allgemeingebräuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache sind in diesem Verzeichnis aus Platzgründen nicht enthalten.

1. EINFÜHRUNG

1.1 Einleitende Betrachtungen

Maligne Neoplasien sind neben Herz-Kreislaufkrankungen weltweit führend in der Mortalitätstatistik. Bei besonders aggressiven Tumoren, wie dem Ösophaguskarzinom, ist es trotz erheblicher Fortschritte im chirurgischen Management nicht gelungen, die frühe Rezidivhäufigkeit und schlechte Prognose wesentlich zu beeinflussen. Ein gravierendes Problem ist der Mangel einer effektiven systemischen Therapie. Um der metastatischen Progression vorzubeugen, ist die Erforschung neuer adjuvanter Therapiestrategien, die die molekulare Komplexität des Tumors berücksichtigen, von entscheidender Bedeutung. Bereits in prämaligen Zellen der Barrettmukosa existieren vielfältige genetische Alterationen, die zu einer malignen Transformation führen und am Tumorprogress beteiligt sind. Von Interesse sind vor allem die Produkte aktivierter Protoonkogene, die im Rahmen der Signalübertragung als Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren fungieren. In zahlreichen Studien konnte ihre essentielle Rolle in Regulation, Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen nachgewiesen werden. Weil die HER2-Genamplifikation sowie die Überexpression des Genproduktes - des Rezeptorproteins p185 - häufig mit der Progression maligner Tumoren assoziiert ist, wurde der Erforschung von HER2 eine besondere Bedeutung beigemessen. So erschlossen sich mit der Entwicklung und der erfolgreichen Anwendung eines gegen HER2 gerichteten Antikörpers neue Therapieoptionen in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms.

Ob HER2 auch beim Adenokarzinom des Ösophagus amplifiziert und/oder überexprimiert wird und somit als Zielstruktur für eine adjuvante Therapie mit diesem Antikörper in Frage kommt, soll in der vorliegenden Arbeit analysiert und diskutiert werden.

1. Einführung

1.2 Das Adenokarzinom des Ösophagus

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das Adenokarzinom des ösophagogastralen Überganges ist im Begriff, sich zur Zivilisationskrankheit des 21. Jahrhunderts zu entwickeln [40]. Während diese Tumorentität vor 30 Jahren noch als Rarität im pathologischen Sektionsgut galt [17], rückte sie in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des klinischen und wissenschaftlichen Interesses. Ursächlich dafür sind:

1. Ein kontinuierlicher Inzidenzanstieg der Adenokarzinome.
2. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der "Volkskrankheit Sodbrennen" und der Entwicklung eines Adenokarzinoms.
3. Mittels Endoskopie und Endosonographie bieten sich im Rahmen präventiver Strategien Möglichkeiten zur Früherkennung.

Epidemiologische Studien zeigen in der westlichen Welt aller 5 - 10 Jahre eine Verdoppelung der Inzidenzrate des Adenokarzinoms [97]. Diese Zunahmerate übertrifft die aller anderen malignen epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Registriert wurde dieser Trend vor allem in den USA, wo Zuwachsraten von > 900% beschrieben wurden [15, 16, 41, 81]. Die Gründe für diese rapide Zunahme sind nach wie vor ungeklärt. Retrospektive Fall-Kontroll-Studien legen nahe, dass soziokulturelle Risikofaktoren - wie Lebensstil, Ernährungsweise und Körpergewicht der Patienten - die Entwicklung eines Adenokarzinoms maßgeblich beeinflussen [15, 17]. Pathogenetisch wichtigster Faktor ist der Reflux von Magensäure, der zu Entzündung, Ulzeration und Strikturen des Ösophagus führen kann. Es wird angenommen, dass bei lang anhaltendem chronischem Reflux eine Differenzierung der Stammzellen des ortsständigen Plattenepithels zu zylindrischen Zellen stattfindet, welche sich in Form eines einschichtigen intestinalen Epithels anordnen. Dieser sogenannte "Endobrachyösophagus" wurde 1950 erstmalig von Norman Barrett beschrieben [11]. Bereits 1952 berichteten Morson und Belcher über eine Häufung von Adenokarzinomen bei Patienten mit Barrett-Ösophagus [85]. Elf Jahre später wurde von Adler erstmalig folgende Kausalität dokumentiert: Die Barrett-Metaplasie stellt die Basis für die Entwicklung von Epitheldysplasien und assoziierten Adenokarzinomen des Ösophagus dar [2].

1. Einführung

Eine Ursache für die Inzidenzzunahme der Adenokarzinome ist in der steigenden Prävalenz von gastroösophagealer Refluxerkrankung (GERD) und Barrett-Ösophagus zu sehen [44]. Refluxursachen sind vor allem die Reduktion des unteren Ösophagussphinkterdruckes sowie eine gestörte ösophageale Motilität. Aufgrund der intraabdominellen Drucksteigerung wirken Hiatushernien und Übergewicht begünstigend [76, 129]. Desweiteren wirken Medikamente, wie Anticholinergika, β -Sympathomimetika, H1- und H2-Rezeptorantagonisten, Nitrate und trizyklische Antidepressiva tonussenkend am unteren Ösophagussphinkter [25, 113, 130, 134]. Paradoxe Weise haben deshalb Patienten mit medikamentöser Antirefluxtherapie ein höheres Karzinomrisiko als untherapierte Patienten [73]. In einer schwedischen Fall-Kontroll-Studie wurde die Korrelation zwischen Refluxstärke/-frequenz und dem Karzinomrisiko bestätigt [73]. In Tierversuchen und Studien mit Refluxpatienten wurde weiterhin gezeigt, dass ein kombinierter duodeno-gastraler Reflux zu toxischen Synergieeffekten führt [67]. Bei fast 50% der Patienten mit erosiver Ösophagitis und Barrett-Ösophagus wurden Deoxycholsäure und Taurodeoxycholsäure in Konzentrationen $> 200 \mu \text{ l/l}$ nachgewiesen. Gallensalze dieser Größenordnungen können Schäden an der Ultrastruktur der ösophagealen Mukosa verursachen und DNA-Mutationen in Zellkulturen verursachen [91].

Bei 15-30% der Bevölkerung tritt regelmäßig eine Refluxsymptomatik auf, doch nur 5-12% dieser Betroffenen entwickeln einen Barrett-Ösophagus [63]. Die Wahrscheinlichkeit, mit der es zur malignen Entartung kommt, wird unterschiedlich beurteilt. Ein erhöhtes Entartungsrisiko galt früher nur für den "Long-Segment-Barrett-Ösophagus" ($> 2\text{-}3 \text{ cm}$), neuere Untersuchungen zeigen dies auch für den "Short-Segment-Barrett-Ösophagus" ($< 2\text{-}3 \text{ cm}$) [114]. Das Risiko an einem Adenokarzinom zu erkranken, liegt für Patienten mit bekanntem Barrett-Ösophagus bei 0,5 - 1% pro Jahr und ist damit 30- bis 125-mal höher als das der Normalbevölkerung [107].

Epidemiologische Studien zeigen, dass ca. 90% der distalen Adenokarzinome bei Männern (Geschlechterverhältnis 8:1) mit weißer Hautfarbe im 5. bis 7. Lebensjahrzehnt auftreten [15].

1. Einführung

Da sich Adenokarzinome nur bei einem geringen Teil der Patienten mit Barrett-Ösophagus entwickeln, werden genetische Prädispositionen vermutet. Im Rahmen von Zwillingsforschungen wurde bei eineiigen Zwillingen eine höhere Konkordanz an Adenokarzinomen festgestellt als bei zweieiigen Zwillingen. Erstgradige Verwandte von Patienten mit Barrett-Ösophagus und Adenokarzinomen leiden zudem häufiger an einer Refluxsymptomatik [34, 45, 102].

Chronischer Säurereflux ist nur bei ca. 60% der Patienten zu finden. Bei dem übrigen Teil scheint die Exposition gegenüber Nitrosaminen, nicht-steroidalen Antiphlogistika oder Radiatio bzw. Chemotherapeutika kritisch für die Krankheitsprogression zu sein [37, 46, 47]. Protektiv scheint hingegen eine Helicobacter pylori-Infektion zu sein. Vor allem die CagA⁺ - Stämme führen über eine Reduktion der Parietalzellen und durch bakterieneigenen Ammoniak zur Verminderung bzw. Neutralisierung der Magensäure [29, 77, 78].

1.2.2 Lokalisation & Metastasierung

Häufigster Sitz der Adenokarzinome ist der ösophago-gastrale Übergang. Entsprechend der topographisch-anatomischen Klassifikation von Siewert [109] werden alle Tumoren, die sich innerhalb von 5 cm ober- bzw. unterhalb der anatomisch definierten Kardiagrenze befinden, folgendermaßen typisiert:

- Typ I : Adenokarzinom des distalen Ösophagus mit kranialer Infiltration des ösophago-gastralen Überganges
- Typ II : Adenokarzinom im Bereich des ösophago-gastralen Überganges
- Typ III : Adenokarzinom des proximalen Magens mit kaudaler Infiltration des ösophago-gastralen Überganges

Das karzinomatöse Wachstum erfolgt innerhalb der Ösophaguswand vorwiegend in Längsrichtung. Das longitudinale, dichte Lymphknotensystem führt zur frühzeitigen Disseminierung und Metastasierung in die Lymphknotenstationen paraösophageal, entlang der kleinen und großen Kurvatur, im Bereich des Truncus coeliacus, der Arteria hepatica, der Arteria lienalis und des Milzhilus [83]. Häufig treten zudem Lymphknotenmetastasen auf, die nicht

1. Einführung

in regionaler Beziehung zum Primärtumor stehen. Die hämatogene Tumorausssaat erfolgt in Leber, Lunge und Skelett.

1.2.3 Klinik

Das klassische Leitsymptom ösophagealer Tumoren ist die Dysphagie, welche von ca. 80% der Patienten bemerkt wird. Über dysphagische Beschwerden wird jedoch erst dann geklagt, wenn der Tumor mehr als die Hälfte des Ösophaguslumens verlegt hat [83]. Bei 17% der Patienten ist der Schluckvorgang schmerzhaft (Odynophagie) [38]. Die übrige Symptomatik ist oft uncharakteristisch. Erste Hinweise - wie retrosternale Schmerzen oder Regurgitation - werden oft ignoriert. 90% aller Karzinome werden im Stadium T2 oder T3 diagnostiziert, bei 2/3 der Patienten hat der Tumor bereits die regionalen Lymphknoten metastatisch durchsetzt [83]. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium bestehen Gewichtsverlust, Kachexie und Anämie. Da der Ösophagus keinen Serosaüberzug hat, können benachbarte Strukturen, wie Trachea, linker Stammbronchus, N. recurrens und Aorta durch den Tumor arrodirt werden. Klinisch äußert sich dies in Husten, Heiserkeit, Pleuraergüssen, Zwerchfellhochstand, Aszites oder einem Horner-Syndrom. Beim Vorliegen einer ösophago-trachealen Fistel können Fieber, Dyspnoe und Pneumonien auftreten [86].

1.2.4 Diagnostik

Initial werden eine Röntgenkontrastmitteluntersuchung und eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie mit Entnahme von Probeexzisionen durchgeführt. Mittels Endosonographie können die Tiefe der Tumorinvasion und die Ausdehnung der Lymphknotenmetastasierung bestimmt werden. Somit kann bei ca. 80% der Patienten der Tumorstatus präzise bestimmt werden [129]. Fernmetastasen können sonographisch, radiologisch und computer-tomographisch nachgewiesen werden [9].

Die Klassifikation des Ösophaguskarzinoms wird nach dem TNM-System der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) vorgenommen [127].

1. Einführung

TNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms

T - Primärtumor

- T_x Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T₀ Kein Anhalt für Primärtumor
- T_{is} Carcinoma in situ
- T₁ Tumor infiltriert die Lamina propria oder Submukosa
- T₂ Tumor infiltriert die Tunica muscularis propria
- T₃ Tumor infiltriert die Adventitia
- T₄ Tumor infiltriert benachbarte Strukturen

N - Regionäre Lymphknoten

- N_x Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N₀ Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N₁ Regionäre Lymphknotenmetastasen

M - Fernmetastasen

- M_x Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M₀ Keine Fernmetastasen
- M₁ Fernmetastasen

Für Tumoren des oberen/unteren thorakalen Ösophagus

- M_{1a} Metastasen in zervikalen/zöliakalen Lymphknoten
- M_{1b} Andere Fernmetastasen

Für Tumoren des mittleren thorakalen Ösophagus

- M_{1a} Nicht anwendbar
- M_{1b} Nichtregionäre Lymphknoten oder andere Fernmetastasen

G - Histopathologisches Grading

- G_x Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G₁ Gut differenziert
- G₂ Mässig differenziert
- G₃ Schlecht differenziert

R- Klassifikation

- R_x Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden
- R₀ Kein Residualtumor
- R₁ Mikroskopischer Residualtumor
- R₂ Makroskopischer Residualtumor

Stadiengruppierung der UICC

Stadium 0	T _{is}	N ₀	M ₀
Stadium I	T ₁	N ₀	M ₀
Stadium IIA	T ₂ , T ₃	N ₀	M ₀
Stadium IIB	T ₁ , T ₂	N ₁	M ₀
Stadium III	T ₃	N ₁	M ₀
	T ₄	Jedes N	M ₀
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M ₁
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M _{1a}
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M _{1b}

1.2.5 Pathomorphologie

Im pathohistologischen Krankengut betragen die Adenokarzinome ca. 50% aller ösophagealen Tumore [17]. Bei 90% der Präparate wird in der Umgebung des Tumors eine Barrett-Mukosa gefunden. Unklar ist, ob in den übrigen 10% eine andere Ätiologie verantwortlich ist oder ob es sich um ein Nachweisproblem handelt, da fortgeschrittene Tumoren die Barrett-Mukosa "überwachsen" können [115]. Es wurden drei Barrett-Ösophagus-Subtypen beschrieben, aber nur der spezialisierte intestinale Typ ist eindeutig mit maligner Transformation assoziiert [94, 121].

Zur Diagnosestellung einer Barrett-Metaplasie wird die Präsenz eines spezialisierten Epithels gefordert, welches wie die intestinale Mukosa aus Zylinderzellen und Muzin-produzierenden Becherzellen aufgebaut ist. Bestehen architektonische und zytologische Abnormitäten mit hyperchromatischen Kernen, Nukleolen und Mitosen, so liegt eine Dysplasie vor. Je nach Ausmaß wird diese als geringgradig (low grade dysplasie) bzw. hochgradig (high grade dysplasie) bezeichnet. Das Barrett-Karzinom wächst multifokal und pleomorph, z. B. als klassisches Adenokarzinom, als Adenoakanthom oder als sarkomatoides Barrett-Karzinom [18]. Das umgebende Epithel weist oftmals dysplastische, hyperplastische und regenerative Veränderungen auf [18].

1. Einführung

Die Herkunft des Barrett-Epithels und die Identität der karzinomatösen Zellen sind nicht vollständig geklärt. Das Karzinom könnte ein Resultat multipler, unabhängiger, oligoklonaler Läsionen ("Feldkanzerization") sein. Andererseits existiert die Theorie der "klonalen Expansion", d.h. das Karzinom entsteht durch die Progression eines einzelnen Klons und präsentiert sich multifokal [39, 63]. Da durch molekulargenetische Analysen hohe Übereinstimmungen zwischen den Aberrationen prämaligener Läsionen und assoziierter Karzinome festgestellt wurden, ist die These der klonalen Expansion wahrscheinlicher [39, 133].

1.2.6 Molekulare Basis

Die Progression von der Metaplasie über die Dysplasie zum Adenokarzinom (Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz [18]) ist mit einer Vielzahl genetischer Ereignisse assoziiert. Die Progression vollzieht sich nicht via uniformen linearen "molekularen pathway", sondern über multiple Wege mit "molekularen Schlüsselereignissen". Am häufigsten sind Induktion von Aneuploidie, Verlust bzw. Mutationen der Tumorsuppressorgene p53 und p16, Überexpression von Cyclin D1, vermehrte Transkription von c-myc und Akkumulation der Zellen in der G2-Phase [13, 64, 98]. Verschiedene Tumorsuppressorgen-Loci, wie z.B. APC (5q), Rb (13q) und das DCC-Gen (18q) zeigen einen Verlust der Heterozygotie (LOH). DNA-Gewinne wurden vor allem bei 8q, 20q, 2p, 7p, 10q, 6p, 15q und 17q detektiert [133]. Chromosomale Verluste wurden vorwiegend am Y-Chromosom, an 4q, 5q, 9q, 18q, 7q und 14q beobachtet [12, 39, 82, 84, 133]. Bei 5-15% der ösophagealen Adenokarzinome tritt eine ubiquitäre Mikrosatelliteninstabilität auf [20, 63].

Im Verlauf der Progression wird nicht nur eine Zunahme, sondern auch eine Veränderung des Musters der genetischen Aberrationen beobachtet [13, 133]. Dies bedeutet, dass in dysplastischen Zellen genetische Veränderungen nachgewiesen werden, die im invasiven Karzinom nicht mehr präsent sind ("Phänomen der genetischen Divergenz") [63, 131]. Im Verlauf der klonalen Evolution entwickeln sich somit divergierende Klone, welche für die intratumorale Heterogenität des Barrettkarzinoms verantwortlich sind [133].

1. Einführung

1.2.7 Therapie

Die Entscheidung über die optimale Therapie für jeden einzelnen Patienten resultiert aus einer Anzahl verschiedener Einflussgrößen. Präoperativ wird ein exaktes Tumorstaging durchgeführt und geprüft, ob Tumorstadium, -lokalisierung und eine eventuelle Infiltration mediastinaler Strukturen eine Operation zulassen. Kontraindikationen für operative Interventionen in kurativer Intention sind hauptsächlich Fernmetastasen.

Hinsichtlich der verschiedenen Intentionen unterscheidet man:

A) Kurative Therapie

Die chirurgische R0-Resektion ist die bevorzugte Methode zur Beseitigung des lokalen Tumorgeschehens [10, 87].

Kombinationen nicht-chirurgischer Therapien (Radiatio, Cisplatin + 5-Fluoruracil) führten bei 25% der Patienten zu ähnlichen Überlebensraten wie beim operativen Modus [46].

B) Palliative Therapie

Therapien, die primär die Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung der Lebensqualität zur Zielsetzung haben, sind ein wichtiger Bestandteil der Therapie ösophagealer Tumoren. Indem der Tumor endoskopisch mit Hilfe eines Lasers, Argon-Beamers oder photodynamischer Therapie zerstört wird, kann die Passagefähigkeit der Speiseröhre wieder hergestellt werden. Falls das Lumen schon zu stark eingengt ist, wird bougiert und ein Metallstent eingesetzt [1, 24, 36]. Im ungünstigsten Fall muss der Patient über eine perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) bzw. Witzel-Fistel ernährt werden [86].

Im Rahmen der Strahlentherapie kommen endoluminale Brachy- und perkutane Strahlentherapien mit einer Dosis von 60-63 Gy zur Anwendung [86, 99]. Bei 15 - 30% der Patienten führt die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, Irinotecan oder Paclitaxel bzw. Doxetaxel zu einer temporären Verkleinerung des Tumors. Bei Kombinationschemotherapien dieser Substanzen mit Cisplatin wurden

1. Einführung

Remissionen bei 35 - 55% der Patienten beobachtet. Die Remissionsdauer war auf wenige Monate limitiert [46].

1.2.7.1 Chirurgische Therapie

Die vorrangige Behandlung von Patienten mit Tumoren der Speiseröhre besteht in der chirurgischen Intervention. Die Auswahl der jeweiligen Operationsmethode wird von mehreren Faktoren, wie z. B. der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors sowie der Konstitution des Patienten, bestimmt.

A) Einfache Ösophagektomie

Bei diesem Verfahren (OP-Technik n. Denk, 1913) wird eine partielle Entfernung des Ösophagus durchgeführt. Die Präparation und Resektion der Speiseröhre kann sowohl von thorakal (abdomino-thorakaler Zugang), als auch zweizeitig von abdominal und zervikal (stumpfe transhiatale Resektion) erfolgen [83].

B) Ösophagektomie mit regionaler Lymphadenektomie

Dieses Verfahren (OP-Technik nach Lewis, 1946) gilt als Standardverfahren in der Therapie des Ösophaguskarzinoms [83]. Zunächst wird der Magen mobilisiert und die kleine Kurvatur samt periösophagealen, perigastrischen und zöliakalen Lymphknoten (inklusive LK entlang der A. hepatica + A. lienalis) entfernt. Anschließend wird durch eine rechtsseitige Thorakotomie der Ösophagus mobilisiert und von begleitenden Strukturen, wie dem Perikard und der Trachea, freipräpariert. Oberhalb des Absetzungsrandes der V. azygos erfolgt die Durchtrennung der Speiseröhre. Paraösophageale und mediastinale Lymphknoten werden zusammen mit der Speiseröhre entfernt [83].

C) Radikale En-bloc-Resektion

Bei dieser Methode werden via rechtsthorakalen Zugang folgende Strukturen reseziert: Ösophagus mit umgebendem Gewebe (Lymphknoten, V. azygos, Ductus thoracicus, Pleura, Perikard, Interkostalgefäße), Kardia und Milz. Bei Durchführung einer 2-Feld-Lymphadenektomie werden zudem abdominelle Lymphknoten im Bereich des Truncus coeliacus, der Milzgefäße und des

1. Einführung

Ligamentum hepato-duodenale entfernt. Bei Tumoren oberhalb der Trachealbifurkation wird die mediastinale und abdominelle Lymphknoten-Dissektion durch eine zervikale Lymphknoten-Entfernung komplettiert (3-Feld-Lymphadenektomie) [83].

Als Ösophagusersatz wird ein Mageninterponat bevorzugt. Der Magenschlauch wird ins hintere Mediastinum hochgezogen und mit dem proximalen Ösophagus anastomosiert. Alternativ können eine Jejunumschlinge oder das Querkolon verwendet werden. Durch verbesserte Operationsmethoden und eine postoperative intensivmedizinische Betreuung konnte die Mortalitätsrate wesentlich gesenkt werden. Für einen Großteil der postoperativen Komplikationen sind kardiopulmonale Defizite und Anastomoseninsuffizienzen verantwortlich [46].

1.2.7.2 Multimodale Therapiekonzepte

Im Rahmen der interdisziplinären Zusammenarbeit werden verschiedene therapeutische Verfahren kombiniert. In einer aktuellen Studie wurden 34 klinische Studien, in denen additive Therapien evaluiert wurden, untersucht. Die Wirksamkeit diverser Radiochemotherapien vor bzw. nach kurativen und palliativen Resektionen in der Behandlung des Ösophaguskarzinoms konnten nicht hinreichend belegt werden [46, 80].

1.2.8 Prognose

Das Ösophaguskarzinom ist der neunthäufigste Krebs weltweit und zählt für Männer zu den zehn häufigsten malignombedingten Todesursachen [122]. Da es keine adäquaten Screening-Programme zur Früherkennung gibt und der Tumor erst in fortgeschrittenen Stadien eine klinische Symptomatik verursacht, ist eine Therapie in kurativer Intention häufig nicht mehr möglich. Bei über 50% der Patienten hat der Tumor bereits metastasiert oder wächst lokal infiltrierend. Somit kann eine R0-Resektion nicht mehr durchgeführt werden kann [46].

Innerhalb von 5 Jahren versterben ca. 70% der Patienten aufgrund eines metastatischen Rezidivs [46]. Interessanterweise treten auch bei R0-resezierten Patienten postoperativ Rezidive auf. Ursächlich sind vor allem eine

1. Einführung

frühe lymphogene Metastasierung und eine zum Diagnosezeitpunkt schwer erfassbare okkulte Fernmetastasierung [70, 93].

Nach chirurgischer Intervention ist die 5-Jahresüberlebensrate stadienabhängig und beträgt im

- Stadium I - 50 - 80%
- Stadium IIA - 30 - 40%
- Stadium IIB - 10 - 30%
- Stadium III - 10 - 15% [46].

Ohne therapeutische Intervention ist die Überlebenszeit nach Diagnosestellung auf 6 - 12 Monate limitiert.

1.3 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

1.3.1 Entdeckung und Struktur

Das Signalnetzwerk der Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) hat sich parallel zur Evolution komplexer Lebensformen entwickelt. Vorläufer dieser Rezeptoren wurden bereits in wirbellosen Organismen, wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nachgewiesen [125]. Die HER-Familie der Säugetiere besteht aus vier engverwandten, homologen Wachstumsfaktorrezeptoren, welche an der Zellmembran lokalisiert sind und folgendermaßen strukturiert sind:

- Extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, welche aus 4 Domänen (I/L1, II/CR1, III/L2, IV/CR2) besteht. Die hohe Diversität zwischen den HER-Familienmitgliedern ermöglicht die spezifische Erkennung verschiedener Liganden. Die Spezifität wird durch Kreuzreaktivität der Liganden erweitert (632 Aminosäuren).
- Transmembranes, lipophiles Segment (22 Aminosäuren)
- Intrazelluläre Domäne mit katalytischer Tyrosinkinaseaktivität. Sie weist eine starke Ähnlichkeit zwischen den HER-Rezeptoren auf, während die flankierenden Sequenzen unterschiedlich sind. Dadurch werden vielfältige Interaktionen mit Rezeptor-spezifischen Effektorproteinen ermöglicht (580 Aminosäuren).

1. Einführung

Die Bedeutung von HER2 wurde initial an Ratten gezeigt. Exposition schwangerer Ratten mit Ethylnitrosoharnstoff (ENU) führte bei den Nachkommen zu Glioblastomen. Die Transfektion von NIH 3T3-Fibroblasten mit Neuroblastom-DNA und anschließende Injektion in gesunde Mäuse führte zur Induktion neuraler Tumore [108]. Durch monoklonale Antikörper gelang die Identifizierung eines Proteins mit einer Molekülmasse von 185 kDa in der Zellmembran der karzinogen-induzierten Neuroblastome [3, 92, 103, 116]. Das Gen, welches dieses transmembrane Glykoprotein p185 kodiert, wurde "*neu*" (Neuroblastom) genannt [103, 108]. Zwei Arbeitsgruppen isolierten unabhängig voneinander das humane Homolog des Ratten-*neu*-Protoonkogens. Coussens et al. bezeichneten das Gen als "HER" (Human Epidermal Growth Factor Receptor), während Semba et al. das Gen in Analogie zum retroviralen ERBB-Onkogen, welches Erythroblastosen bei Vögeln verursacht, "c-erbB" nannten [33, 106]. Sequenzanalysen und chromosomale Studien ergaben, dass alle 3 Gene (c-*neu*, c-*erbB*-2, HER2) identisch sind. Analysen des HER2-Gen ergaben strukturelle Homologien mit dem bekannten *erbB*-1-Gen (HER1), welches für den Wachstumsfaktorrezeptor EGFR kodiert [33]. Aufgrund detaillierter Sequenzvergleiche beider Proteine vermuteten Coussens et al., dass sich beide Gene durch Duplikation aus einem Ur-Gen entwickelt haben und dass Nukleotidsequenzunterschiede die spezifischen biologischen Rollen der Polypeptide definieren. Dabei wurden Homologien von bis zu 78, 4% zwischen EGFR (1210 Aminosäuren) und HER2 (1255 Aminosäuren) festgestellt [33]. Die Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich folgender molekularbiologischer Eigenschaften [33, 103, 128]:

	HER2	EGFR
Genlokus	Chr.17q12-21	Chr.7p11-p13
mRNA	4, 8 kb	5, 8 kb und 10, 5 kb
Protein	185 kDa	170 kDa

Hybridisierungen humaner cDNA mit EGFR-Sequenzen führte zu weiteren Mitgliedern dieser Transmembranrezeptorfamilie, die konsekutiv HER3 und HER4

1. Einführung

genannt wurden [72, 96]. Ungeachtet ihrer Gesamtstrukturähnlichkeit besitzen die vier Rezeptoren unterschiedliche Autophosphorylierungsstellen, Substratspezifitäten und Kinaseaktivitäten.

1.3.2 Funktion

Die HER-Rezeptoren sind Bestandteile eines komplexen Netzwerkes, in dem nach Bindung extrazellulärer Liganden verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, welche die Expression und Funktion von Zellzyklusregulatoren modulieren.

Die HER-Rezeptoren liegen in monomerer Form vor, so dass die assoziierte Tyrosinkinase inaktiv ist. Bei Ligandenbindung können stabile Homo- und Heterodimere mit insgesamt zehn verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten gebildet werden, wobei heterodimere Formationen energetisch günstiger als homodimere sind [88]. Die Rezeptordimerisierung ist Voraussetzung für die Aktivierung rezeptor-assoziiierter intrazellulärer Tyrosinkinasen. Durch Autophosphorylierung der Kinasen können diese mit verschiedenen Molekülen reagieren, die entweder direkt als "second messenger" oder als Adapterproteine für nachgeschaltete "second messenger" agieren [59, 72, 100, 101].

Effektormoleküle mit SH2- oder PTB-Domänen dienen als Adapter, die parallele, interagierende oder überlappende Kaskaden aktivieren. Eine große Anzahl zytoplasmatischer Proteine, wie z. B. Grb-2, 7 und Src reagieren mit den aktivierten Rezeptoren [8, 22, 105]. Andere spezifische Substrate sind Phospholipase C- γ 1 und PI3-Kinase [31, 75, 119]. Trotz der vielfältigen Transmissionsmoleküle werden zwei Signalwege als Haupttrouten konserviert - MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). Diese Signalwege wurden bereits bei Wirbellosen beobachtet [21, 57].

1. Einführung

1.3.3 Liganden und Bindungsmechanismen

Die HER-Rezeptoren interagieren mit einer großen Anzahl Wachstumsfaktoren, die anhand ihrer Bindungsspezifitäten in drei Klassen eingeteilt werden [60]:

- 1. Gruppe:** Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor- α (TGF- α) und Amphiregulin binden spezifisch an HER1
- 2. Gruppe:** Heparin-bindender EGF-like Growth Factor (HB-EGF), Betacellulin (BTC) und Epiregulin binden an HER1 und HER4
- 3. Gruppe:** Neureguline (NRGs) binden an HER3 und HER4

Die sterische Konfiguration der Rezeptoren ist sehr komplex. Für die Ligandenbindung sind die extrazellulären Domänenstrukturen I und III von Bedeutung. Im nichtaktivierten Zustand hat die Domäne II intramolekularen Kontakt mit der Domäne IV und führt zu einer "geschlossenen Rezeptorform" [28, 51]. Die Aufrechterhaltung dieser Konformation bei Ligandenabwesenheit ist eine Barriere vor Autoaktivierung. Bei Bindung eines Liganden erfolgt ein "Domänenrearrangement" zu einer "offenen Form". Durch das Rearrangement wird die Domänen II-IV-Interaktion aufgehoben, während die Domänen I und III in enge räumliche Nähe gebracht werden. Diese Prozesse ermöglichen die Rezeptordimerisation und Initiierung der Signaltransduktion [28].

Durch proteolytische Prozesse kann die extrazelluläre Domäne abgespalten und im Serum nachgewiesen werden. Der intrazelluläre Rezeptoranteil bleibt an der Zellmembran und kann die anderen Rezeptoren weiter aktivieren [42].

1.3.4 Besonderheiten des HER2-Rezeptors

HER2 unterscheidet sich in seiner extrazellulären Rezeptorkonfiguration wesentlich von den anderen Rezeptoren. Die Domänen-II-IV-Interaktion, die das Domänenarrangement in nicht-aktivierten Rezeptoren einschränkt, fehlt bei HER2. Stattdessen ist die Dimerisationsschleife in Domäne II offen [28, 52]. Ursächlich ist der Austausch von zwei wichtigen Aminosäuren in der Domäne IV-Kontaktregion (Glycin 563 und Histidin 565 sind ersetzt durch Prolin und Phenylalanin) [27]. Zusätzlich ist die Ausrichtung des Domänenpaares I/III

1. Einführung

relativ zu dem Domänenpaar III/IV verändert [28]. Diese konstitutive "offene" Struktur des HER2 bietet eine Erklärung für verschiedene Eigenschaften:

A) Elf verschiedene HER-Liganden wurden identifiziert [65]. **Für HER2 konnte kein spezifischer hoch affiner Ligand gefunden werden.** Die fixierte offene Konformation ähnelt dem Liganden-aktivierten Status. Dadurch ist HER2 intrinsisch imstande, mit anderen Bindungspartnern zu interagieren. Aufgrund der Ligandenlosigkeit und der Abhängigkeit von anderen HER-Familienmitgliedern halten einige Autoren HER2 lediglich für eine getrennte Signaluntereinheit [69].

B) Die Interrezeptor-Interaktionen innerhalb der HER-Familie sind hierarchisch gegliedert. **HER2 fungiert als universaler HER-Korezeptor, welcher als Interaktionspartner bevorzugt wird** [28]. Die heterodimere Assoziation mit HER2 führt zu erhöhter Sensibilität gegenüber Ligandenstimulation und folglich zu stärkeren und prolongierten Signaleffekten [54]. Vermutlich bestimmt die Rezeptoridentität sowohl die Intensität als auch die Kinetik der MAPK-Aktivierung. Dabei gibt es einen Intensitätsanstieg von Homo- zu Heterodimeren, der dann am höchsten ist, wenn HER2 enthalten ist [53, 95].

C) **Die Überexpression von HER2 in Zellkulturzellen führt zur HER2-Aktivierung und zu einem transformierten Phänotyp** [42, 120]. Da es keine auto-inhibierte Konformation gibt, existiert keine Barriere vor einer Autoaktivierung. Dies ist zum Teil mitverantwortlich für das transformierende Potential bei Überexpression [28].

Die Fähigkeit von HER2 die Signalgebung in Liganden-unabhängiger Weise zu verstärken, wird im Folgenden anhand des Liganden Neuregulin-1 (NRG-1) erklärt [125]:

NRG-1 ist ein bivalentes Molekül, welches zwei Bindungsstellen für HER-Rezeptoren besitzt: eine hochaffine, sehr spezifische, N-terminale Seite und eine niedrigaffine, wenig spezifische, C-terminale Seite. Die hochaffine Seite

1. Einführung

bindet an den spezifischen Rezeptor (HER3/HER4). Daraufhin ist die niedrig-affine Seite an der Plasmamembran immobilisiert. Die Immobilisation führt zur Steigerung der Affinität für potentielle Dimerpartner. Der Rezeptor, der nun bevorzugt an diesen Ligandenarm bindet, ist HER2. Es wird vermutet, dass eine gering-affine, wenig spezifische Bindungstasche innerhalb des HER2-Rezeptors existiert, die ihn als Korezeptor favorisiert.

In allen Einzelheiten ist die supportive Funktion von HER2 noch nicht geklärt. Beim HER2/HER3-Komplex vervollständigt HER2 den Kinase-defizienten HER3 durch Bereitstellung einer aktiven Tyrosinkinase und Verstärkung der Ligandenbindung an HER3 [126]. Erfolgt die Induktion des HER2/HER3-Komplexes durch Neureguline, so resultiert die höchste Signalaktivität unter allen Rezeptorkombinationen [95, 100]. Diese Formation wird häufig in Adenokarzinomen verschiedener Gewebe nachgewiesen [26]. Obwohl HER1 und HER4 intakte Kinasen besitzen, führt auch bei ihnen die Assoziation mit HER2 zu mitogener Überlegenheit [6, 135].

Aus folgenden Gründen ist die Erzeugung von Proliferationssignalen durch HER2-Heterodimere wesentlich potenter als durch andere Kombinationen:

1. HER2-Heterodimere sind sehr stabil. Dies beruht auf der relativ langsamen Ligandendissoziation vom Rezeptor, die zur Konversion von einer niedrigaffinen zu einer hochaffinen Wachstumsfaktorbindungsstelle führt [7]
2. HER2-Heterodimere sind mit einer breiten Spezifität für verschiedene Liganden ausgestattet. Sie binden EGF-ähnliche Liganden im mikromolaren Bereich, während die Bindungsaffinität der Liganden an ihren primären Rezeptor im nanomolaren Bereich liegt [125].
3. Signale, die durch HER2-Heterodimere generiert werden, führen zu einem verstärkten proliferativen Ansprechen auf Liganden [131].
4. Die Internalisierungsrate des HER2-Rezeptorkomplexes ist etwa eine Größenordnung geringer als jene vom EGFR [14, 95].
5. Die Entfernung der Rezeptoren von der Zelloberfläche (Downregulation) ist eine Schlüsseldeterminante der Signaldauer. In Abhängigkeit von

1. Einführung

Ligandenbindung und Rezeptorkonfiguration wird entweder eine Endozytose mit anschließendem Recycling zur Zelloberfläche oder die Degradation in Lysosomen durchgeführt. Homodimere führen zu geringer Signalleitung, denn sie werden rasch internalisiert und degradiert. Ein HER2-Heterodimer liegt beim endosomalem pH 5,5 vollständig dissoziiert vor und wird erneut an die Zelloberfläche geschleust. Durch dieses "Recycling" wird die Signalaktivierung aufrechterhalten [69].

1.3.5 HER2-Expression in adulten und fetalen Geweben

HER2 ist in einer Vielzahl humaner adulter und fetaler Gewebe präsent. Das HER2-Signalnetzwerk vermittelt Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen, wie z.B. zwischen Neuronen und Muskelfasern in neuromuskulären Synapsen, Schwann-Zellen und Neuronen im peripheren Nervensystem und zwischen Endokard und Myokard während der Herzentwicklung [23]. Die Bedeutung von HER2 bei der Entwicklung von Säugetieren wurde an Mäuseembryonen mit einer HER2-Nullallel-Konfiguration untersucht [74]. Die Embryonen starben vor dem 11. Gestationstag. Mortalitätsursache war eine kardiale Dysfunktion aufgrund fehlender Trabekel. In postnatalen Herzmuskelzellen führte die Abwesenheit von HER2 zu einer Vergrößerung beider Ventrikel im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie [35]. Die Entwicklung neuronaler Strukturen bei den Mäuseembryonen war durch ein Mangel an HER2 ebenfalls beeinträchtigt [74]. In verschiedenen anderen Organen (Niere, Gastrointestinaltrakt) war die HER2-Expression von untergeordneter Bedeutung [30, 90].

1.3.6 Bedeutung in der Karzinogenese

Die HER2-Aktivierung ist mit einer Reihe zellulärer Effekte, beispielsweise Proliferation, Invasion, Metastasierung, Angiogenese, Adhäsion, Resistenz gegenüber Chemo- und Hormontherapien sowie Inhibierung von Apoptose verknüpft [128]. Folglich sind HER2-amplifizierte/-überexprimierende Tumorzellen durch einen aggressiveren Phänotyp charakterisiert [69]. Anhand der ENU-exponierten Ratten konnte das experimentelle Modell der HER2-induzierten Karzinogenese sehr detailliert charakterisiert werden. Weitere Effekte der

1. Einführung

HER2-Überexpression konnten *in vitro* durch die Transformation von NIH 3T3-Zellen und *in vivo* durch Injektion HER2-überexprimierender transfizierter NR6-Zellen in Nacktmäuse beobachtet werden [42, 58]. Im Falle einer starken HER2-Überexpression resultierte eine Transformation von NIH 3T3 Zellen, bei moderater HER2-Expression wurde keine Transformation beobachtet [42]. Die klinische Bedeutung dieser Laborobservation wurde primär an Mammakarzinomen untersucht und 1987 von Slamon et al. in Science publiziert [110]. In dieser Studie wurde bei 20-30% der Patientinnen mit Mammakarzinom eine HER2-Amplifikation nachgewiesen. Diese war mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf, einer höheren Rezidivhäufigkeit sowie einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert [110, 111]. In weiteren klinischen Studien wurden HER2-Genamplifikation und/oder p185-Überexpression bei Mamma-, Ovarial-, Kolon-, Magen-, Pankreas-, Blasen-, Nieren- und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen nachgewiesen [60, 69].

1.3.7 HER2 beim Adenokarzinom des Ösophagus

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation gab es nur eine unzureichende Datenlage zum HER2-Status beim Ösophaguskarzinom. In der Zwischenzeit sind mehrere Studien publiziert worden. Eine HER2-Genamplifikation wurde bei 15-35% der Ösophaguskarzinome nachgewiesen [5, 19, 134]. Die publizierten p185-Überexpressionsraten variieren von 10% bis 73% [5, 43, 48, 49, 55, 56, 62, 68, 89, 134]. Die Bedeutung von HER2 für die Progression ösophagealer Adenokarzinome ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bezüglich der prognostischen Bedeutung des HER2-Status liegt ebenfalls eine variable Datenlage vor. Eine Korrelation zwischen HER2-Genamplifikation und einer schlechteren Prognose wurde von Brien et al. beschrieben [19]. Der Großteil der durchgeführten Studien ergab eine Korrelation von HER2-Überexpression mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf und einer kürzeren Überlebenszeit [19, 48, 89]. In einigen Studien konnte hingegen kein Einfluss auf den klinischen Verlauf gefunden werden [49, 56]. Einmal wurde sogar über das

1. Einführung

umgekehrte Phänomen berichtet, nämlich dass die HER2-Überexpression mit einer längeren Überlebenszeit einherging [43].

1.3.8 Therapeutische Bedeutung von HER2

Seit Mitte der 80-er Jahre wird das HER2-Onkogenprodukt p185 als Zielmolekül therapeutischer Interventionen erforscht. Trastuzumab (Herceptin®) ist die humanisierte Form des murinen monoklonalen Antikörpers 4D5, der die übermäßige Rezeptorexpression herunterreguliert und einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bewirkt. Dieser Antikörper wurde 1998 von der FDA zur Therapie des metastasierten Mammakarzinoms in den USA zugelassen (als Monosubstanz für die second-line Behandlung und in Kombination mit Taxol® zur first-line Therapie) und wird mittlerweile auch in Deutschland erfolgreich als immunologische Therapieoption eingesetzt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Das Adenokarzinom des Ösophagus ist ein aggressiver, prognostisch ungünstiger, maligner Tumor, für dessen Behandlung keine effektiven adjuvanten Therapiekonzepte existieren. Das HER2-Gen wird als therapeutische Zielstruktur beim Mammakarzinom bereits mit Erfolg genutzt. Um nun eine gegen HER2 gerichtete molekulare Therapie ("targeted therapy") als adjuvante Therapieoption auch bei ösophagealen Adenokarzinomen diskutieren zu können, war vor allem die Frage wichtig, ob das HER2-Gen beim Adenokarzinom des Ösophagus amplifiziert ist und ob das Genprodukt p185 überexprimiert wird. Hierfür sollten im Rahmen dieser Promotionsarbeit folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- I. Nachweis der Amplifikation des HER2-Gens
- II. Nachweis der Überexpression des HER2-Proteins p185
- III. Korrelation zwischen HER2-Genamplifikation und p185-Überexpression
- IV. Korrelation der HER2-Genamplifikation und p185-Überexpression mit histopathologischen Parametern

2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Eine Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme wurde von allen beteiligten Patienten schriftlich gegeben. Bei 72 Patienten mit Adenokarzinomen des gastroösophagealen Überganges, die in den Jahren 1992 - 2002 operiert wurden, konnten intraoperativ Tumorproben asserviert werden. Bei allen Patienten wurde eine radikale en-bloc-Ösophagektomie durchgeführt.

Tabelle 2.1: Verteilung des Patientenkollektivs gemäß TNM-Klassifikation.

Primärtumor	Patienten
pT1	12 (17%)
pT2	29 (40%)
pT3	29 (40%)
pT4	2 (3%)
Lymphknotenstatus	
pN0	17 (24%)
pN1	55 (76%)
Fernmetastasierung	
M0	68 (94%)
M1	4 (6%)
Differenzierungsgrad	
G2	27 (37%)
G3	45 (63%)
Resektionsstatus	
R0	68 (94%)
R1	4 (6%)

2. Patienten, Materialien und Methoden

In dem Kollektiv befanden sich 55 Männer und 17 Frauen mit einem medianen Alter von 67 Jahren. Die Einteilung der untersuchten Tumoren gemäß der TNM-Klassifikation wird in Tabelle 2.1 dargestellt.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Chemikalien

<u>Materialien zur Herstellung der Schnitte</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalognummer</u>
Peel-A-Way® S-22 (Disposable Embedding Molds)	Polysciences	18646A
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura	4583
Objektträger Super Frost® Plus	Menzel	041300
Mikrotom zur Herstellung von Gefrierschnitten	Microm	HM 505 E
Mikrotom zur Herstellung von Paraffinschnitten	Microm	HM 335 E

Reagenzien für Hämalaun-Eosin-Färbung

Rotihistol	Roth	6640.1
Aceton	Biesterfeld	
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma	MHS-32
Eosin G	Merck	1.15935.
Aquatex®	Merck	1.08562.
Entellan®	Merck	1.07961.
Deckgläser (18 x 18 mm)	Marienfeld	

<u>Reagenzien für Immunhistochemische Färbungen</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalognummer</u>
Hercep-Test™	DAKO	K 5204
Monoclonal Mouse-anti-HER2 (c-erbB-2)	Zymed	08-1203
DAKO EnVision™+System, HRP (DAB)	DAKO	K 4006
Aqua ad iniectabilia	Baxter	1227915
PAP-Pen	DAKO	S 2002
Na ₂ HPO ₄	Merck	1.06587.
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04875.

2. Patienten, Materialien und Methoden

NaCl	Baker	0278
NaOH 1M	Merck	1.09137.

Reagenzien für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

PathVysion™ HER2 DNA Probe Kit	Vysis	30-161060
Methanol z. A.	Merck	1.06009.
Formaldehyd 37% (stabilisiert mit 10% Methanol)	Merck	1.04000.
HCl c(HCl)=1 mol/l (1N)	Merck	1.09057.
Pepsin (Porcine stomach mucosa, 2,030 units)	Sigma	P-7012
PBS Dulbecco`s w/o Ca+Mg, w/o Sodium Bicarbonate	Gibco	14190-094
Ethanol absolut z.A.	Merck	1.00983.
MgCl ₂	Merck	1.05835.
Formamid deionisiert (für Molekularbiologie)	Sigma	F-9037
Fixogum	Marabu	
DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindol)	Vysis	30-161060
NP 40 (im PathVysion™ HER2 DNA Probe Kit)	Vysis	30-161060

Zusammensetzung der Waschpuffer

PBS	428 ml	KH ₂ PO ₄
	1072 ml	Na ₂ HPO ₄
	90 g	NaCl
	<u>16 ml</u>	<u>1M NaOH</u>
	pH 7,4	
20 x SSC (Natriumchlorid und Natriumcitrat)	66 g	20xSSC
	<u>200 ml</u>	<u>aqua dest.</u>
	250 ml	20 x SSC, pH 5,3
2 x SSC	100 ml	20 x SSC, pH 5,3
	<u>900 ml</u>	<u>aqua dest.</u>
	1000 ml	2 x SSC, pH 7,4

2. Patienten, Materialien und Methoden

2 x SSC/ NP40	100 ml	20 x SSC, pH 5,3
	847 ml	aqua dest.
	<u>3 ml</u>	<u>NP-40</u>
	1000 ml	2xSSC/ 0,3% NP-40 pH 7,4

Lösungen für Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung

Methanol/2%Formaldehyd-Lösung	94 ml	Methanol
	6 ml	37% Formaldehyd

500 ml 50mM MgCl ₂ /PBS	5,083 g	MgCl ₂
	500 ml	PBS

RNase-Stocklösung	10 mg	RNase A
	100 ml	2 x SSC

Pepsinstocklösung	1 g	Pepsin
	10 ml	Aqua dest.

Formamidlösung pH 7,0 - 8,0	49 ml	Formamid
	7 ml	20 x SSC
	14 ml	aqua dest.

DNA - Sonden

Für den Nachweis der HER2-Genamplifikation wurde ein kommerzielles Testsystem (PathVysion™HER2 DNA Sonden-Kit) der Fa. Vysis verwendet:

- Die LSI HER2/neu DNA-Sonde ist eine 190 kb mit SpectrumOrange direktmarkierte Fluoreszenz-DNA-Sonde (low copy number E.coli Vector) für den Genlocus HER2/neu (17q11.2-q12).
- Die CEP 17 DNA-Sonde ist eine mit 5,4 kb SpectrumGreen direktmarkierte Fluoreszenz-DNA-Sonde (E.coli Plasmid) für alpha-

2. Patienten, Materialien und Methoden

Satelliten-DNA im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1).

Antikörper

Polyklonaler Kaninchen-anti-Human-HER2-Protein-Antikörper A0485 (Fa. Dako, HercepTest™)

- Gebrauchsfertiger affinitätsisolierter Antikörper, gelöst in 50 mM Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 15 mM NaN₃, pH 7,2

Negatives Kontroll-Reagenz (Fa. Dako, HercepTest™)

- Immunglobulinfraktion aus Kaninchen-Normalserum in einer äquivalenten Proteinkonzentration analog HER2-Primärantikörper gelöst in 50 mM Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 15 mM NaN₃, pH 7,2

Monoklonaler Mouse-anti-HER2 TAB250 (Fa. Zymed)

- Immunogen: NIH 3T3 Zellen wurden mit c-erbB-2 transfiziert
- Klon: TAB250
- Isotyp: Mouse IgG1-kappa
- Totalproteinkonz.: 17g/L, Mouse Ig-Konz.: 0,25 mg/L

Der Antikörper ist gebrauchsfertig (enthält PBS, 1% BSA und 0,1% Natriumazid) und vorverdünnt (second gen predilute antibody).

2.2.2 Gewebe

Intraoperativ wurden die Operationspräparate, welche Tumor, Lymphknoten und gesunde Mukosa (im Folgenden als "Normalgewebe" bezeichnet) enthielten, entnommen und mittels eines kleinen Plastikgefäßes (peel-away) und einem entsprechenden Einbettmedium (Tissue-Tek) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei –80°C. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms wurden Serienschnitte mit einer Dicke von 4-5 µm angefertigt, auf Objektträger (OT) aufgezogen und im Gefrierschrank bei –20°C gelagert.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.3 Methoden

2.3.1 Hämatoxylin - Eosin – Färbung (H&E Färbung)

Um das intraoperativ entnommene Tumormaterial zu beurteilen, wurde von allen Tumoren eine Übersichtsfärbung angefertigt, die von zwei Personen unabhängig voneinander begutachtet wurde.

Für die Übersichtsfärbung werden die OT 2 min in Aceton fixiert und nach einer kurzen Spülung in Aqua dest. für 5 min in Hämalaunlösung gestellt. Anschließend kommen die Schnitte für 10 min unter fließendes Leitungswasser (Blaufärbung aufgrund des alkalischen pH-Wertes). Nach der dreiminütigen Inkubation in 0,1% Eosin werden die Präparate in Aqua dest gewaschen und mit Aquatex eingedeckt.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung mit A0485

Zur Antigendarstellung wurde eine Enzym-Immunkomplex-Methode verwendet. Der DAKO HercepTest™ enthält alle Reagenzien in gebrauchsfertiger Form zur Durchführung einer immunhistochemischen 2-Schritt-Färbung. Im ersten Schritt bindet der Kaninchen-Primärantikörper an das humane HER2-Protein. Anschließend wird ein Peroxidase-konjugiertes Dextranpolymer appliziert, das über einen ebenfalls konjugierten Ziege-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper den Primärantikörper detektiert. Die enzymatische Umwandlung des nachfolgend hinzugegeben Chromogens (DAB) führt zur Bildung eines braunen Reaktionsproduktes.

Die kryokonservierten Gewebeschnitte werden 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, dann 2 min in Aceton fixiert und anschließend in Tris-Puffer gewaschen. Jeder Inkubationsschritt wird durch zwei Spülgänge mit jeweils 10-minütiger Inkubation im Waschpuffer beendet. Alle Inkubationsschritte finden bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer statt.

Als erstes erfolgt die fünfminütige Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität mittels 3% Wasserstoffperoxid. Anschließend wird der Antikörper aufpipettiert. Pro Patient werden zwei Gewebeschnitte gefärbt - auf einen OT wird A0485, auf den anderen wird das Negativ-Kontroll-Reagenz pipettiert und 30 min inkubiert. Zur Validierung und Kontrolle der Färbung wird ein Kit-interner

2. Patienten, Materialien und Methoden

Kontroll-Objektträger mitgeführt, der drei Zelllinien mit paraffineingebetteten, humanen Brustkrebszelllinien (ATCC) enthält. Die Vorbereitung dieses OT verläuft initial anders, da eine Entparaffinierung, Dehydratisierung (2 x 5 min. Xylol, 2 x 3 min 95% Alkohol, 2 x 3 min. 70% Alkohol, 30 sec. Aqua dest.) und ein spezielles Pretreatment vorangehen müssen, um das Gewebe adäquat auf die Reaktion mit dem Antikörper vorzubereiten (Demaskierung des Epitops). Dazu werden die Schnitte 40 min in einer Küvette mit Epitop-Retrieval-Lösung in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 95 – 99°C erhitzt. Anschließend wird der Objektträger in die Färbeprozedur integriert.

Nach dem Primärantikörper wird das Visualization Reagent (HRP- konjugiertes, goat-anti-rabbit-Polymer) für 30 min aufpipettiert. Es handelt sich um ein Dextranpolymer, welches mit Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulinen sowie Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Im Anschluß werden 100 µl der Substrat-Chromogenlösung (DAB) aufpipettiert. Nach 10 min wird die Reaktion durch einen Spülgang in destilliertem Wasser beendet, anschließend erfolgt die Kernfärbung und die Eindeckung der Präparate.

2.3.2.1 Auswertung

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte an einem Mikroskop der Fa. Olympus. Die Farbintensität der Tumorzellen korreliert mit der HER2-Rezeptoranzahl pro Zelle. Da der HercepTest™ ein semiquantitativer Nachweis ist, genügt zur Quantifizierung positiver Tumorzellen die Übersichtsmikroskopie (40-fache Vergrößerung) und die Einteilung in > bzw. < 10% angefärbte Zellen. Bei 100-facher Vergrößerung ist ein eindeutiges Beurteilen möglich.

Zur Bestimmung der Überexpression des HER2-Proteins werden ausschließlich Quantität und Qualität der Membranfärbung begutachtet. Zytoplasmatische Färbungen gelten als unspezifisch. Als Interpretationsrichtlinie zum HER2-Scoring der Patientenproben dient der „Atlas for Interpretation of Hercep Test™ Staining“ (DAKO-Broschüre Nr. 20210) (Tabelle 2.2).

2. Patienten, Materialien und Methoden

Tabelle 2.1 Dako HercepTest™-Score zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis des HER2-Protein.

Färbemuster	Score	Beurteilung der HER2-Proteinüberexpression
Keine Färbung zu sehen bzw. weniger als 10% der Tumorzellen zeigen eine membranständige Anfärbung	0	Negativ
Eine schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung ist in mehr als 10% der Tumorzellen zu sehen. Die Zellen zeigen eine nur unvollständige Membranfärbung.	1 +	Negativ
Eine schwache bis moderate komplette Membranfärbung wird in mehr als 10% der Tumorzellen festgestellt.	2 +	Schwach / Moderat Positiv
Eine starke, die komplette Membran umfassende Färbung wird in mehr als 10% der Tumorzellen beobachtet.	3 +	Stark Positiv

2.3.3 Immunhistochemische Färbung mit TAB250

Diese Färbung verläuft nach dem gleichen Schema wie der HercepTest™. Nach Fixierung und Peroxidaseblockung werden 100 µl TAB250 bzw. negatives Kontrollreagenz aufpipettiert und für 30 - 60 min inkubiert. Für die folgende Kaskade wurde eine 2-Schritt-Immunhistochemie verwendet (DAKO EnVision™-System mit Peroxidase). Der Kit enthält alle Reagenzien in gebrauchsfertiger Form: Ein Meerrettichperoxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus-Immunglobulin bindet an den Primärantikörper (Inkubation 30 - 60 min) und führt anschließend zur enzymatischen Zersetzung von DAB (Inkubation 10 min). Abschließend Spülung in Aqua dest, Kernfärbung (5 min Mayers Hämatoxylin) und Eindeckung der Präparate mit Aquatex.

2. Patienten, Materialien und Methoden

Alle Inkubationen erfolgen in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach jedem Inkubationsschritt werden drei Waschgänge im PBS-Puffer zu jeweils 5 min durchgeführt.

2.3.3.1 Auswertung

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte analog dem HercepTest™-Score (Tabelle 2.2).

2.3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH können Aberrationen der DNA visualisiert werden. Hierbei werden nach einer speziellen Gewebepreparation spezifische Fluoreszenz-markierte Sonden appliziert.

Zunächst werden die kryokonservierten Gewebeschnitte 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt die Fixierung für 10 min in -20°C kalter Methanol/ 2%Formaldehyd-Lösung. Die Objektträger werden 3 mal für je 5 min in 2 x SSC gestellt. Zur Eliminierung störender RNA werden 100 μl RNase-Lösung aufpipettiert, dann erfolgt die Inkubation für 1h in der feuchten Kammer im 37°C -Wasserbad. Anschließend wird der Proteinandaue durchgeführt, der zur Permeabilisierung der Zellen führt und störende Proteine entfernt. Dazu werden 50 μl Pepsin in eine 37°C temperierte Küvette mit 100 ml 0,01 M HCl gegeben. Da die Tumorproben sehr heterogen sind, ist es nötig, individuelle Proteinandauezeiten zu ermitteln. Durchschnittlich genügen 7 min (Inkubationszeit 6-10 min) im 37°C -Wasserbad. Sofortiges Überführen der Objektträger in PBS beendet die Pepsinwirkung, anschließend verbleiben die Schnitte für 2 x 5 min in der Küvette mit PBS.

Zur Stabilisierung der DNA wird eine Nachbehandlung in 500 ml 50mM MgCl_2/PBS für 5 min durchgeführt. Zur Fixierung des angedauten Zustandes werden 200 μl PFA aufpipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Waschen in PBS beendet die Nachfixation. Anschließend werden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihenfolge (70% - 85% - 100%) bei 4°C für je 1 min dehydriert und dann luftgetrocknet. Die Denaturierung der DNA erfolgt für 5 min in einer Formamidlösung im 78°C -Wasserbad. Die Denaturierungstemperatur in der Küvette beträgt 72°C . Mit einer 4°C -kalten aufsteigenden Alkoholreihe (70%

2. Patienten, Materialien und Methoden

- 85% - 100%) wird die Formamidlösung von den Schnitten entfernt. Erst werden die Objektträger für 2-5 min auf einer 45-50°C warmen Wärmeplatte getrocknet, dann werden ca. 10 µl der Sondenmischung auf das Gewebe aufpipettiert und mit einem Deckglas abgedichtet. Die Objektträger inkubieren in einer feuchten Kammer im 37°C-Wasserbad für 12-24 h. Am nächsten Tag werden die OT erst im Waschpuffer 2xSSC/0,3% NP-40 bei Raumtemperatur gespült, anschließend für 2 min in eine 72°C-warme Waschpufferlösung gestellt und dann im Dunkeln getrocknet. Die anschließende Applikation von DAPI dient der Darstellung der Zellkerne. Da die Fluorophore unter Lichteinfluss schnell ausbleichen, werden die Präparate bei -20°C in lichtgeschützten Kästen aufbewahrt.

2.3.4.1 Auswertung

Zur besseren Lokalisation der Tumorzellareale wurde vorher eine HE-Übersichtsfärbung angefertigt (Kap. 2.3.1). Da viele Tumoren eine heterogene Morphologie aufwiesen, wurden mehrere Areale analysiert. Die Einstellung des entsprechenden Areals erfolgte mit 10facher Vergrößerung des Fluoreszenzmikroskopes. Die Hybridisierung der HER-2/neu-Sonde ergibt ein rotes Signal, die CEP 17-Sonde stellt sich grün dar. Die Rest-DNA fluoresziert aufgrund der DAPI-Färbung blau. Mit einer 100-fachen Vergrößerung erfolgte die Auszählung von ca. 60 Zellkernen pro Tumor und die tabellarische Dokumentation der HER-2/neu-Signale und der Chromosom 17-Signale. Die Amplifikationsrate (HER2-Ratio) ist der Quotient aus den durchschnittlichen HER-2/neu-Signalanzahlen / Zellkern und den durchschnittlichen Chromosom 17-Signalanzahlen / Zellkern.

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde das SPSS 11.0 Softwaresystem für Windows, sowie Microsoft Excel 2000 verwendet. Als deskriptive Statistiken wurden Mittelwert, Median, Standardabweichung, sowie der kleinste und größte Wert ermittelt. Bei Angaben in Prozent wurde die dritte Stelle hinter dem Komma ggf. auf- oder abgerundet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert. P-Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als Tendenz bewertet. Die Mittelwerte wurden immer mit der Standardabweichung

2. Patienten, Materialien und Methoden

angegeben.

Um Unterschiede zwischen Tumor und gesundem Gewebe bei der HER2 bzw. Chromosom 17-Signalanzahl auf ihre statistische Signifikanz zu überprüfen, wurde der Mann-Whitney-Test als Rangsummentest zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen mit nicht-parametrischer Datenverteilung verwendet. Dieser Test wurde ebenfalls angewendet, um die Chromosom 17-Signalanzahl zwischen Tumoren mit und ohne p185 Überexpression zu vergleichen.

Um zu überprüfen, ob die mit A0485 und TAB250 analysierte p185 Expression miteinander korreliert, wurde der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient im Spearman Rangsummentest berechnet.

Der Fisher-Exakt-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob sich zwei Gruppen in Bezug auf eine Eigenschaft signifikant unterscheiden. Dieser Test kam bei allen Korrelationen zwischen HER2 bzw. p185 Status und den histopathologischen Parametern zum Einsatz. Für die Vierfeldertafeln wurden die Gruppen dichotomisiert – lokal begrenzte (pT1-2) vs. lokal fortgeschrittene (pT3-4) Tumoren, sowie gut differenzierte (G1/G2) vs. schlecht differenzierte (G3) Tumoren. Die p185 Expression wurde ebenfalls dichotomisiert und in Tumoren mit p185 Überexpression ("2+" und "3+") und solche ohne p185 Überexpression ("0" und "1+") eingruppiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.1.1 Durchschnittliche HER2-Signalanzahl

Die durchschnittliche HER-Signalanzahl der Tumore ergibt sich aus dem Quotienten der gezählten HER2-Signale und der Anzahl der gezählten Zellkerne des Tumors. Die durchschnittliche HER-Signalanzahl betrug bei den 72 untersuchten Tumoren im Mittel $4,19 \pm 2,47$ mit einem Median von 3,55 (min. 1,7 - max. 17,0). Somit war die HER2-Signalanzahl der Tumore signifikant höher als die der 10 ausgewerteten Normalgewebe, welche im Mittel $1,5 \pm 0,156$ (min. 1,2 - max. 1,7) betrug (Mann-Whitney-Test, $p < 0,001$) (Abbildung 3.1).

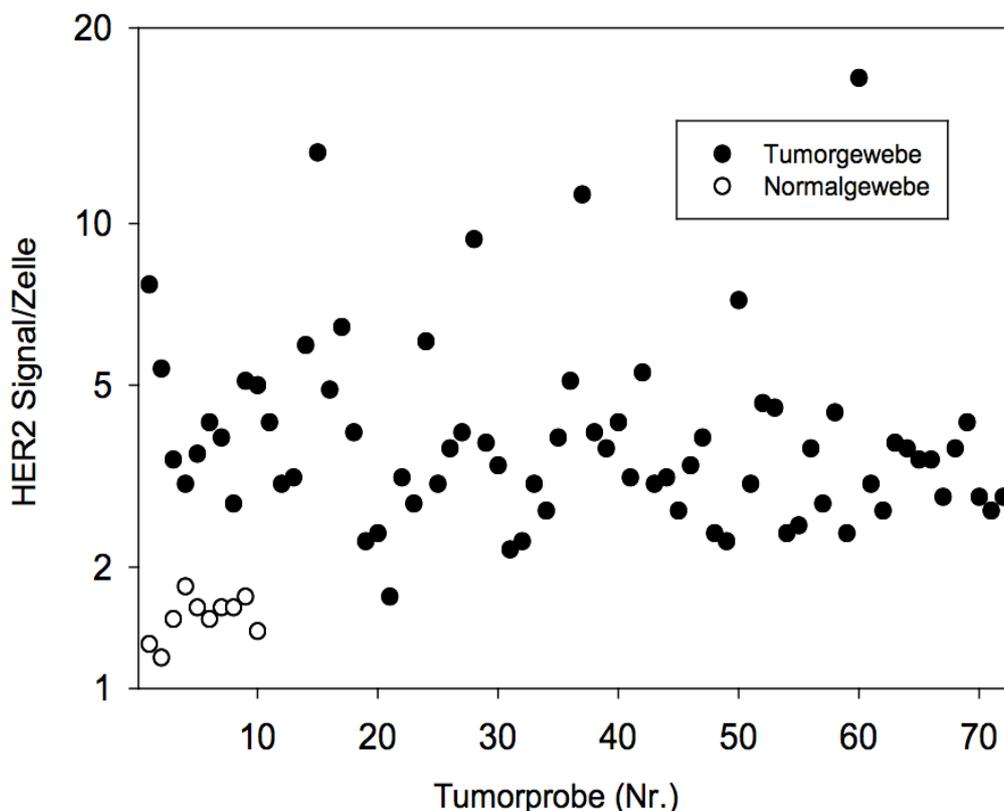


Abbildung 3.1: Durchschnittliche HER2-Signalanzahl in analysiertem Tumorgewebe und gesunder Mukosa (Normalgewebe)

3. Ergebnisse

3.1.2 Durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl

Das Adenokarzinom des Ösophagus gehört zu den chromosomal instabilen Tumoren. Es war folglich anzunehmen, dass Aneusomien von Chromosom 17 - dem Chromosom auf dem das HER2-Gen lokalisiert ist - häufig auftreten. Um nun eine echte HER2-Genamplifikation von einer erhöhten HER2-Genkopienzahl durch Chromosom 17-Aneusomie abzugrenzen, wurde parallel zur HER2-Sonde (roter Fluoreszenzfarbstoff) eine alpha-Satellitensonde für Chromosom 17 (grüner Fluoreszenzfarbstoff) als interne Kontrolle hybridisiert.

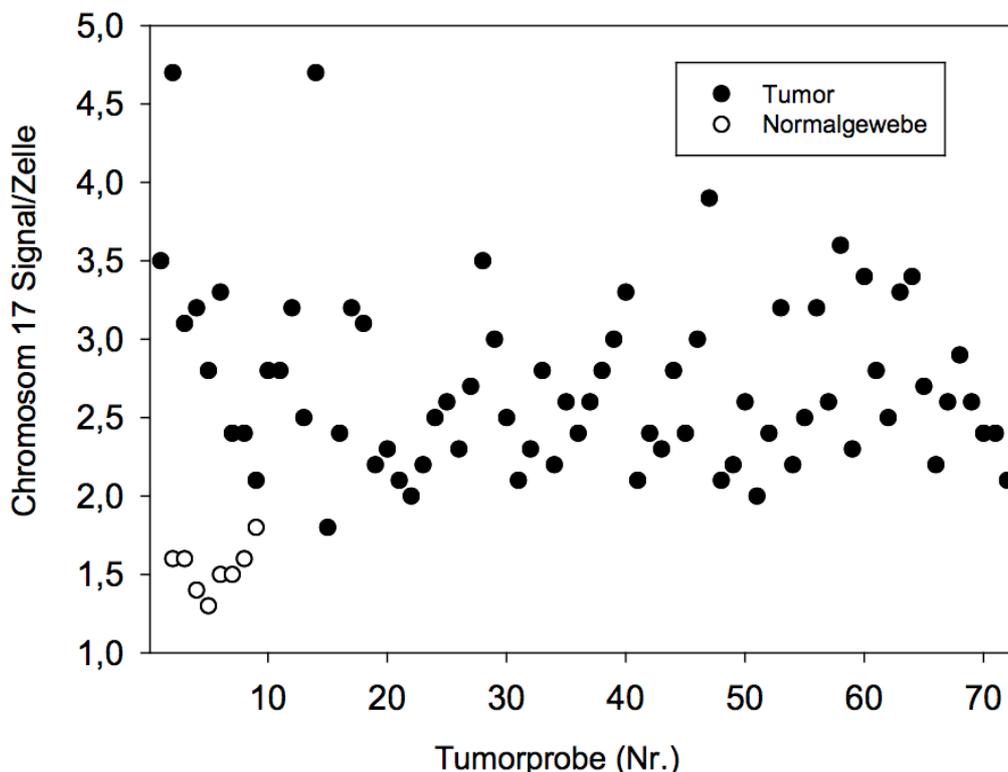


Abbildung 3.2: Durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl in den analysierten Tumorgeweben und Normalgeweben

Betrachtet man bei den analysierten Tumoren nur die durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl (Abbildung 3.2), die analog zur mittleren durchschnittlichen HER-Signalanzahl ermittelt wurde, konnte ein mittlerer chromosomaler Index von $2,71 \pm 0,57$ mit einem Median von 2,60 (min. 1,8 - max. 4,7) festgestellt werden. Die durchschnittliche mittlere Chromosom 17-Signalanzahl im Tumorgewebe war gegenüber der des gesunden Gewebes

3. Ergebnisse

(n=10), welche $1,5 \pm 0,14$ (min. 1,3 – max. 1,8) betrug, signifikant erhöht (Mann-Whitney-Test, $p < 0,001$).

3.1.3 HER2-Genamplifikation in Bezug auf die HER2-Ratio

Entsprechend den Herstellerangaben (PathVysion™, Fa. Vysis) liegt eine Genamplifikation vor, wenn der Quotient aus HER2-Signalen pro Zellkern und Chromosom 17-Signalen pro Zellkern $> 2,0$ beträgt. Die Berechnung des Quotienten ermöglicht die Differenzierung einer Genamplifikation des HER2-Lokus gegenüber vermehrten HER2-Signalen durch Chromosom 17-Polysomie. Mit dieser Auswertungsmethode betrug die HER2-Amplifikationsrate in den analysierten Adenokarzinomen 18% (13/72). Bei 82% (59/72) der Tumorproben wurde keine HER2-Genamplifikation nachgewiesen. Das Signalmuster der HER2-Sonden war bei den ösophagealen Adenokarzinomen durch eine starke Heterogenität charakterisiert. In einigen Zellkernen lagen singuläre Signale vor (Abbildung 3.3.A), in anderen Tumorzellen wurden Signalcluster, die aus 10 - 20 konfluierenden Einzelsignalen bestehen, beobachtet (Abbildung 3.3 B).

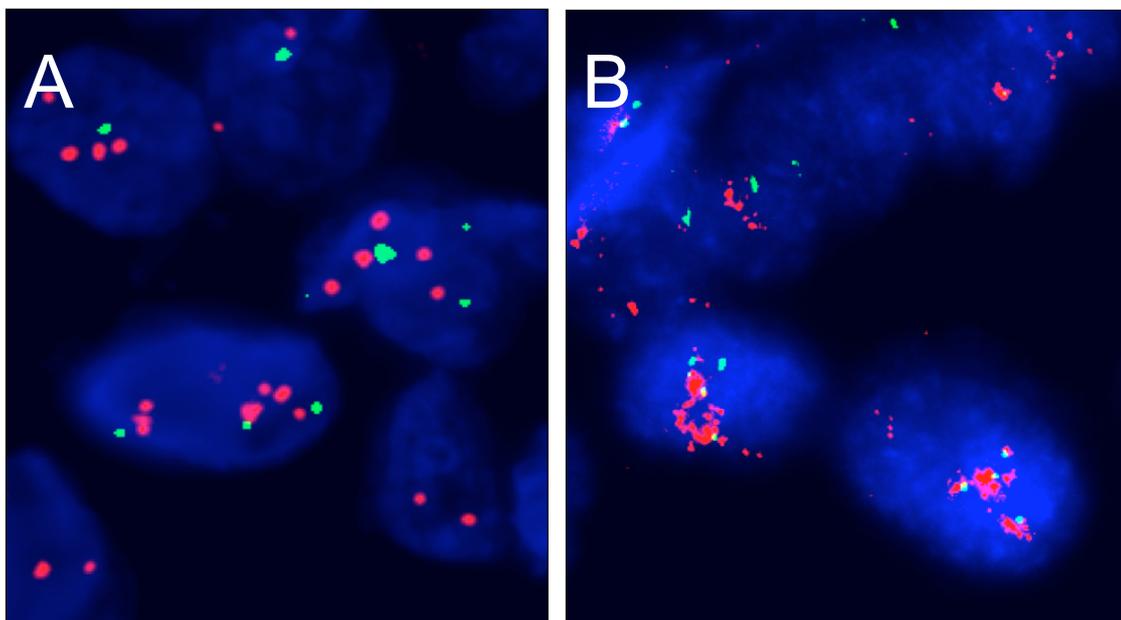


Abbildung 3.3: Beispielhafte Darstellung in-situ-hybridisierter Tumoren.

A) Tumor mit "low-level" Amplifikation, B) Tumor mit "high-level" Amplifikation. Die HER2-Sonde ist in rot, die Chromosom 17 Sonde in grün dargestellt.

3. Ergebnisse

Zudem lagen auch bei Tumoren mit hoher Amplifikationsrate einzelne Tumorzellareale vor, in denen keine HER2-Genamplifikation nachgewiesen wurde. Interessanterweise wurden bei 20% (14/59) der nicht als HER2-amplifiziert gewerteten Tumore ebenfalls HER2-Signalcluster beobachtet.

Bezogen auf die durchschnittliche HER2-Genkopienanzahl pro Tumorzelle - ohne Berücksichtigung des Chromosom 17-Status - kann die HER2-Amplifikation in eine geringe ("low-level") und eine starke ("high-level") Amplifikation unterteilt werden (Abbildung 3.3, 3.4):

- 1) Eine **"low-level"-HER2-Amplifikation** - durchschnittlich sind 4 - 9 HER2-Signale/Nukleus präsent - trat bei 69% (9/13) der HER2-amplifizierten Tumoren auf (Abbildung 3.3 A, 3.4 A).
- 2) Eine **"high-level"-HER2-Amplifikation** - durchschnittlich sind ≥ 10 HER2-Signale pro Nukleus präsent - trat bei 31% (4/13) der amplifizierten Tumoren auf (Abbildung 3.3 B, 3.4 B).

In keinem der 10 untersuchten ösophagealen gesunden Gewebe (Normalgewebe) fand sich eine HER2-Genamplifikation.

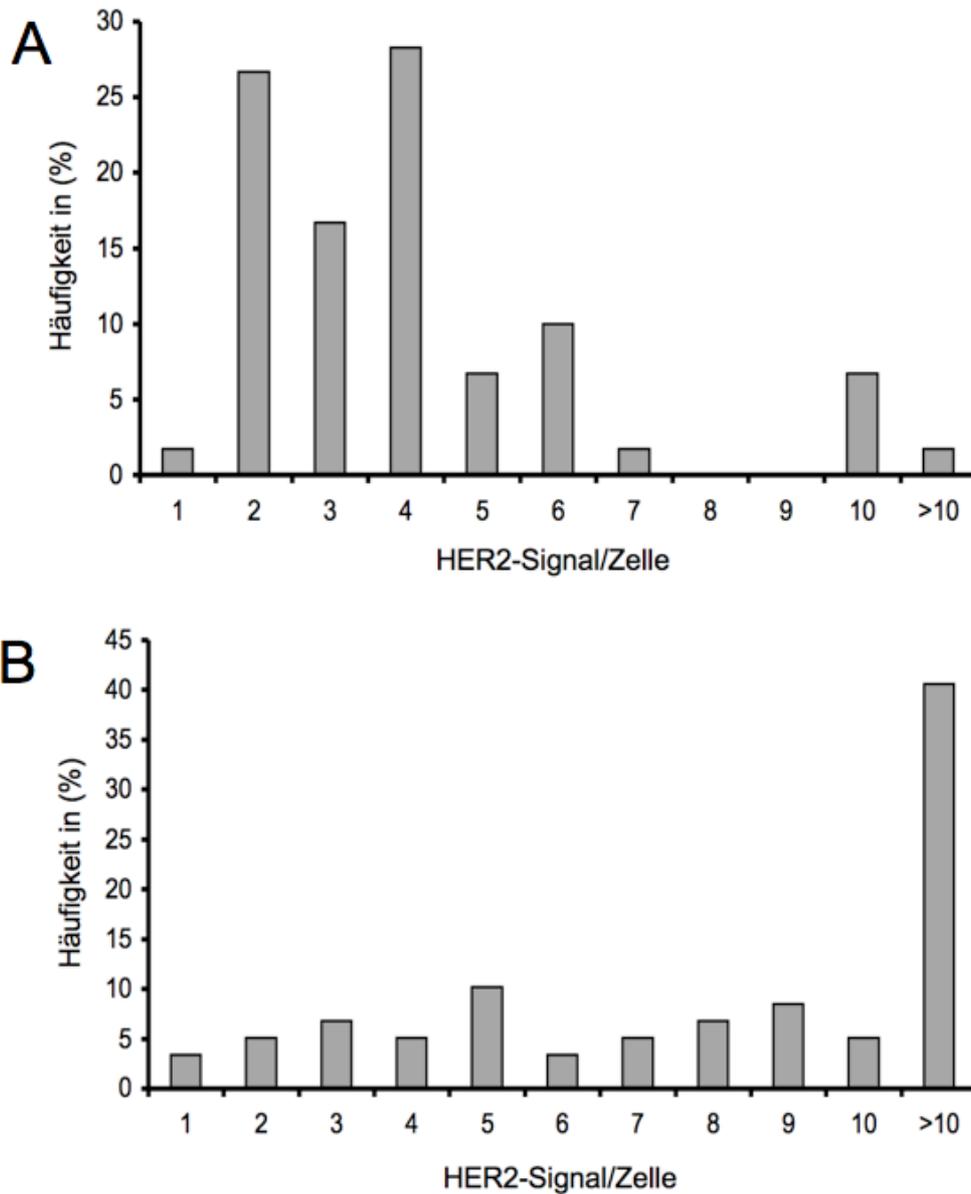


Abbildung 3.4: Beispielhafte Darstellung der Verteilung von HER2-Signalen in einem Tumor mit (A) „low-level“ Amplifikation und (B) „high-level“ Amplifikation.

3.1.4. HER2-Genamplifikation in Bezug auf Chromosom 17 Aneusomie

In einem nächsten Schritt wollten wir analysieren, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von HER2-Amplifikationen und der Aneuploidie existiert. Als Anhaltspunkt für die Aneuploidie haben wir die Aneusomie des Chromosoms 17 gewählt. Die Untersuchung ergab, dass die HER2-Amplifikation unabhängig von der durchschnittlichen Chromosom 17 Signalan-

3. Ergebnisse

zahl ist. Bei den mittleren durchschnittlichen Chromosom 17-Signalanzahlen konnten keine signifikanten Differenzen zwischen den Tumoren mit HER2-Amplifikation (n=13; Mittelwert $2,712 \pm 0,579$) und den Tumoren ohne HER2-Amplifikation (n=59; $2,708 \pm 0,533$) festgestellt werden. Der verwendete Rangsummentest zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0,73, Mann-Whitney Test). Diese Unabhängigkeit wird in Abbildung 3.5 visuell dargestellt. Die mittlere HER2-Signalanzahl pro Zelle wurde in Beziehung zur mittleren Chromosom 17-Signalanzahl pro Zelle gesetzt, die HER2-amplifizierten Tumoren wurden schwarz markiert (Abbildung 3.5).

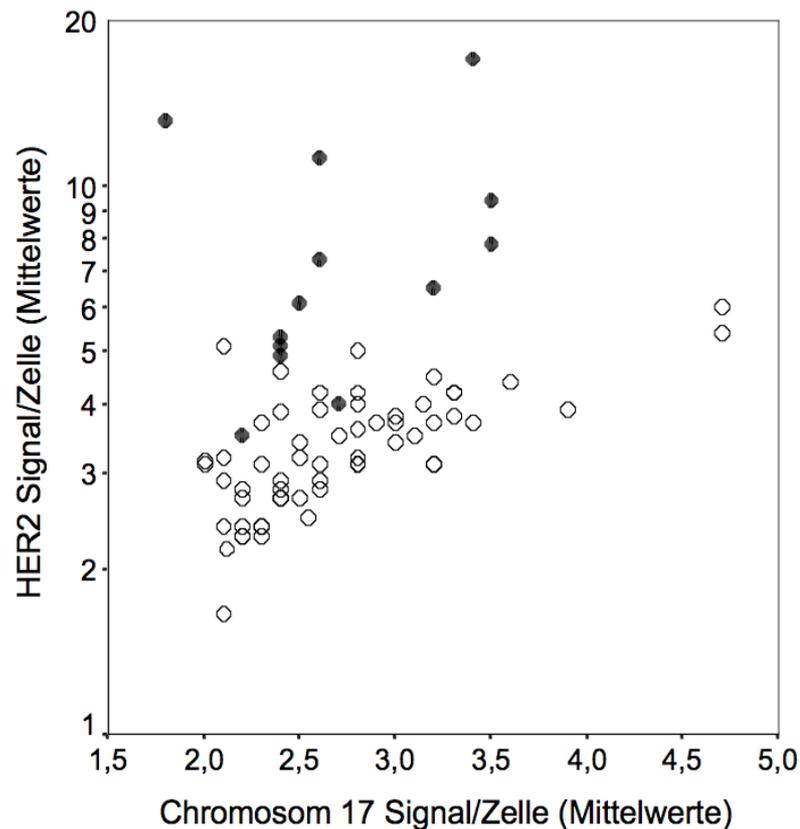


Abbildung 3.5: Durchschnittliche HER-Signalanzahl in Bezug auf die durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl. Die HER2-amplifizierten Tumorproben sind dunkel markiert.

3. Ergebnisse

3.1.5. Vergleich HER2-Genkopienzahl vs. HER2/Chromosom 17-Ratio

Legt man die vom Hersteller des FISH-Assays empfohlene Berechnung der Ratio zugrunde, beträgt die HER2-Amplifikationsrate bei den analysierten ösophagealen Adenokarzinomen 18% (13/72). Würde man ausschließlich die durchschnittlichen HER2-Genkopienzahlen pro Nukleus ohne Berücksichtigung des Chromosom 17-Status werten, wären 38% (27/72) der Adenokarzinome HER2-amplifiziert (23 Tumoren der Kategorie "low level"-Amplifikation und 4 Tumoren der Kategorie "high level"-Amplifikation). In Tabelle 3.1 wird die durchschnittliche HER2-Signalanzahl der HER2/ Chromosom 17-Ratio gegenübergestellt.

Tabelle 3.1: Vergleich der durchschnittlichen HER2-Genkopienanzahl/ Nukleus vs. HER2/CEP 17-Ratio bei 72 Adenokarzinomen des Ösophagus (Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die HER2-Ratio).

Durchschnittliche HER2-Signalanzahl/ Tumorzellkern	Keine HER2-Amplifikation (Ratio < 2)	HER2-Amplifikation (Ratio >2)
≤ 4 HER2-Signale / Zellkern	45 (62,5 %)	0 (0 %)
≥ 4 bis 9 HER2-Signale "low-level"- Amplifikation	14 (19,4%)	9 (12,5 %)
≥ 10 HER2-Signale "high-level"- Amplifikation	0 (0%)	4 (5,5%)

3. Ergebnisse

	Keine HER2-Amplifikation (Ratio < 2)	HER2-Amplifikation (Ratio >2)
Gesamtzahl Adenokarzinome (n=72)	59 (82%)	13 (18%)

Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich ist, sind Tumoren mit ≤ 4 HER2-Signalen / Zellkern niemals HER2-amplifiziert und Tumoren ≥ 10 Signalen / Zellkern - sogenannte "high level"-amplifizierte Tumoren - immer HER2-amplifiziert. Es werden 69% (9/13) der HER2-amplifizierten Tumoren (Ratio > 2) in die Kategorie der "low level"-Amplifikation eingeordnet, während nur 31% (4/ 13) "high level"-amplifiziert sind. Desweiteren werden in der Kategorie "low level"-Amplifikation (23 Tumoren) 61 % (14/23) nicht-amplifizierte und 39% (9/23) amplifizierte Tumoren subsumiert.

3.2 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung des HER2-Rezeptorproteins p185 erfolgte zum einen mit dem polyklonalen Antikörper A0485, der gegen die intrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptorproteins gerichtet ist und zum anderen mit dem monoklonalen Antikörper TAB250, der die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors detektiert. Der Antikörper A0485 war als erster Antikörper für die Diagnostik und Therapieplanung zugelassen und ist daher als „Goldstandard“ zu werten. Als Interpretationsrichtlinie zur Beurteilung und Klassifikation der Färbeergebnisse wurde der "Atlas for Interpretation of HercepTest™ Staining" (DAKO-Broschüre Nr. 20210, Tabelle 2) verwendet. Dieser wurde im Kapitel 2.3.2.1, Tabelle 2.2 beschrieben. Da die Antikörper das membranständige Protein detektieren und bei beiden die Membranfärbung beurteilt wird, haben wir für beide Antikörperfärbungen die HercepTest-Klassifikation angewendet.

3. Ergebnisse

Grundsätzlich waren bei den ösophagealen Adenokarzinomen zwei Muster der Immunreaktivität zu beobachten: eine membranständige, zirkuläre Färbung und eine zytoplasmatische, diffuse Färbung. Per definitionem (Hercep Test™) wird nur die Anfärbung der Zellmembran für die Klassifikation der immunhistochemischen Färbung gewertet (Abbildung 3.6 A, B). Hinsichtlich einer geplanten Therapie mit Herceptin™ ist ausschließlich diese Expressionsform von Bedeutung. Während die stark überexprimierten Tumoren (Gruppe "3+") ein homogenes Färbemuster zeigten, wiesen die übrigen Tumoren ein heterogenes Färbemuster auf. Es färbten sich innerhalb der Präparate einige Zellgruppen intensiver als andere an. Zum Teil lagen stark positive Areale ("3+") neben negativen Tumorarealen ("0" ; "1+").

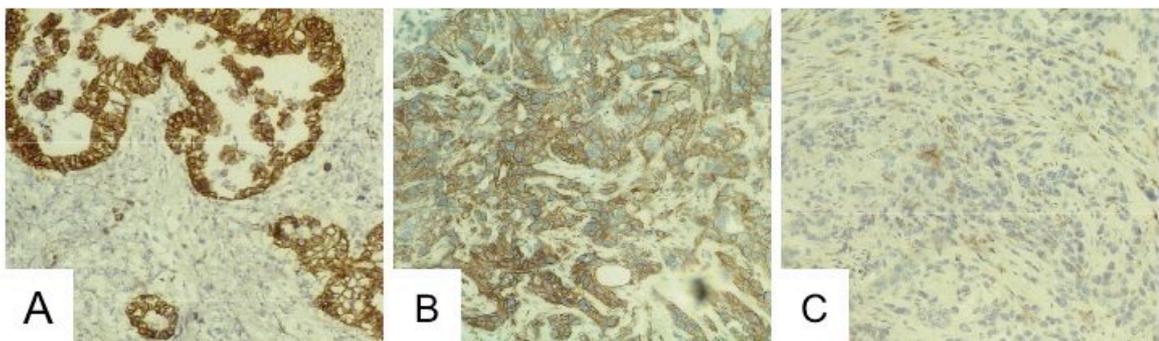


Abbildung 3.6: Darstellung der p185-Überexpression in drei exemplarisch dokumentierten ösophagealen Adenokarzinomen:
A) Überexpression (Gruppe "3+"); B) moderate Expression (Gruppe "2+"); C) Keine Expression (Gruppe "0").

3.2.1 Vergleichende Analyse von A0485 und TAB250

In der immunhistochemischen Färbung mit dem polyklonalen Antikörper A0485 zeigten 51% (37/72) der Tumoren eine Überexpression des Proteins p185 (Färbeverhalten "2+" ; "3+"). Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers TAB250 wurde bei 35% (25/72) der Tumoren eine Überexpression des Membranproteins p185 nachgewiesen. In nachfolgender Tabelle 3.2 werden die Tumoren nach ihrem immunhistochemisch detektierten Expressionsgrad eingeteilt.

3. Ergebnisse

Tabelle 3.2: Verteilung des HER2-Expressionsmusters bei Färbung mit A0485 und TAB250.

p185 Expressionsgrad	Antikörper A0485	Antikörper TAB250
0	15 (21%)	28 (39%)
1+	19 (26%)	17 (24%)
2+	20 (28%)	9 (12%)
3+	18 (25%)	18 (25%)
Gesamt	72 (100%)	72 (100%)

Werden die Resultate beider immunhistochemischer Färbungen hinsichtlich der Überexpression von p185 ("2+" ; "3+") miteinander verglichen, so zeigte sich vor allem bei den negativen ("0" ; "1+") und stark positiven ("3+") Präparaten eine hohe Konkordanz. Trotz der Abweichungen im Bereich "2+" (Tabelle 3.2) war die Korrelation zwischen den Färbeergebnissen beider Antikörper mit einem Spearman-Rho Korrelationskoeffizienten von 0,626 statistisch signifikant ($p < 0,001$, Spearman-Test).

3.3 Korrelation von HER2-Genamplifikation und p185-Überexpression

Zwischen der HER2-Genamplifikationsrate und der Überexpression des Genproduktes p185 fand sich ein hoch signifikanter Zusammenhang bei beiden Antikörpern (A0485 $p = 0,002$; TAB250 $p < 0,001$, Fisher-Exakt-Test). Zwölf der 13 (92%) HER2-amplifizierten Tumoren zeigten eine starke p185-Überexpression ("3+"). Bei einem der 13 (8%) HER2-amplifizierten Tumoren wurde mit beiden Antikörpern p185-Negativität auf immunhistochemischer Ebene nachgewiesen. Umgekehrt war die Überexpression von p185 bei der Mehrzahl

3. Ergebnisse

der Tumoren jedoch nicht mit einer HER2-Genamplifikation assoziiert. Eine Überexpression des Rezeptorproteins p185 wurde bei 42% (25/59) [A0485] bzw. 22% (13/59) [TAB250] der nicht HER2-amplifizierten Tumoren nachgewiesen (Tabellen 3.3, 3.4).

Tabelle 3.3: HER2-Amplifikation und p185-Überexpression [A0485].

	Keine HER2-Amplifikation	Amplifikation
Keine p185-Expression ("0" - "1+")	34 (58%)	1 (8%)
p185-Überexpression ("2+" - "3+")	25 (42%)	12 (92%)
Anzahl Tumore (n=72)	59 (100%)	13 (100%)

Tabelle 3.4: HER2-Amplifikation und p185-Überexpression [TAB250].

	Keine Amplifikation	Amplifikation
Keine p185-Expression ("0" - "1+")	46 (78%)	1 (8%)
p185-Überexpression ("2+" - "3+")	13 (22%)	12 (92%)
Anzahl Tumore (n =72)	59 (100%)	13 (100%)

3. Ergebnisse

Da es trotz signifikanter Korrelation von Genamplifikation und p185-Überexpression einige Tumoren gab, die auch ohne Amplifikation eine Überexpression aufwiesen (Tabellen 3.3, 3.4), stellte sich die Frage, ob auch eine Gendosiserhöhung durch Polysomie des Chromosoms 17 für eine p185-Überexpression ursächlich sein könnte. Wir haben daher in einem Rangsummentest die durchschnittliche Chromosom 17-Signalanzahl von Tumoren mit p185 Überexpression ("2+" ; "3+") mit Tumoren ohne p185 Expression ("0"; "1+") verglichen. Hierbei zeigte sich bezüglich der Anzahl von Chromosom 17 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (A0485 $p=0,545$, TAB250 $p=0,852$, Mann-Whitney-Test).

3.4 Korrelation von HER2-Genamplifikation und p185-Überexpression mit histopathologischen Parametern

3.4.1 HER2-Genamplifikation

Es war keine signifikante Korrelation zwischen der HER2-Genamplifikation und der Tumorgröße bzw. der Lymphknotenmetastasierung festzustellen. Es zeigte sich jedoch ein Trend hinsichtlich einer Assoziation zwischen HER2-Amplifikation und einer besseren Differenzierung des Primärtumors ($p=0,069$, Fisher-Exakt-Test) (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Korrelation von HER2-Genamplifikation mit histopathologischen Parametern.

Histopathologische Parameter	Nicht-HER2 amplifizierte Tumoren	HER2-amplifizierte Tumoren
Tumorstadium		
pT1 - pT2	32 (78%)	9 (22%)
pT3 - pT4	27 (87%)	4 (13%)

3. Ergebnisse

Histopathologische Parameter	Nicht-HER2 amplifizierte Tumoren	HER2-amplifizierte Tumoren
Lymphknotenmetastasierung		
pN0	13 (22%)	4 (31%)
pN1	46 (78%)	9 (69%)
Differenzierungsgrad des Tumors		
G2	19 (32%)	8 (62%)
G3	40 (68%)	5 (38%)

3.4.2 Überexpression des Genproduktes p185

3.4.2.1 Polyklonaler Antikörper A0485

Bei der Berechnung der Beziehung zwischen p185-Überexpression und Primärtumorgröße konnte keine statistisch signifikante Korrelation erhoben werden. In Analogie zur Amplifikation zeigte sich auch hier eine Assoziation zwischen Überexpression und einer besseren Differenzierung des Primärtumors ($p=0,03$; Fisher Exakt-Test). Es fand sich ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen p185-Überexpression und dem Lymphknotenstatus, da sich in der Gruppe ohne Lymphknotenmetastasen deutlich weniger nicht überexprimierte Fälle befanden ($p=0,028$; Fisher Exakt-Test) (Tabelle 3.6).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.6: Korrelation von p185-Überexpression [IHC mit A0485] mit histopathologischen Parametern.

Histopathologische Parameter	Nicht-p185 überexprimierte Tumoren	p 185- überexprimierte Tumoren
Tumorstadium pT1 - pT2 pT3 - pT4	17 (50%) 17 (50%)	24 (63%) 14 (37%)
Lymphknotenmetastasierung pN0 pN1	4 (12%) 30 (88%)	13 (34%) 25 (66%)
Differenzierungsgrad des Tumors G2 G3	8 (24%) 26 (76%)	19 (50%) 19 (50%)

3.4.2.2 Monoklonaler Antikörper TAB250

Die Berechnung zwischen der mit dem Klon TAB250 erfassten p185-Überexpression und der Primärtumorgröße bzw. dem Lymphknotenstatus ergab keine statistisch signifikante Korrelation. Hinsichtlich der Tumordifferenzierung zeigte sich ein umgekehrter Trend, da die immunhistochemisch detektierte HER2-Negativität mit einem besserem Differenzierungsgrad assoziiert war ($p=0,085$, Fisher-Exakt-Test) (Tabelle 3.7).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.7: Korrelation p185-Überexpression [IHC mit TAB250] mit histopathologischen Parametern.

Histopathologische Parameter	Nicht-p185 überexprimierte Tumoren	p185-überexprimierte Tumoren
Tumorstadium pT1 - pT2 pT3 - pT4	24 (53%) 21 (47%)	17 (63%) 10 (37%)
Lymphknotenmetastasierung pN0 pN1	10 (22%) 35 (78%)	7 (26%) 20 (74%)
Differenzierungsgrad des Tumors G2 G3	13 (29%) 32 (71%)	14 (52%) 13 (48%)

4. DISKUSSION

4.1 HER2-Amplifikation beim Adenokarzinom des Ösophagus

Bei Studienbeginn war die Datenlage bezüglich der Häufigkeit der HER2-Amplifikation beim Adenokarzinom des Ösophagus unzureichend. In der Zwischenzeit haben sich einige Studiengruppen mit der Prävalenz der HER2-Amplifikation beim ösophagealen Adenokarzinom beschäftigt [5, 19, 134]. Eine Übersicht der Studienresultate im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: HER2-Amplifikation beim Adenokarzinom des Ösophagus in Schnittpräparaten (keine Tissue-Mikroarray Studien).

Autoren	Anzahl analysierter Tumoren	Materialien & Methoden	Anzahl gezählter Zellkerne	HER2-Amplifikationsgrad
Al Kasspooles [5]	13	Gefriergewebe Southern Blot	Komplettes Tumorareal	15%
Brien [19]	63	Paraffingewebe Dig-HER2-Sonde, FISH	40 Tumorzellen	19%
Walch [134]	23	Paraffingewebe Zwei-Farben-FISH	Komplettes Tumorareal	35%
Vorliegende Studie	72	Gefriergewebe Zwei-Farben-FISH	60 Tumorzellen	18%

4. Diskussion

Die verschiedenen Resultate sind zum einen vor dem Hintergrund methodologischer Unterschiede bei den verwendeten Nachweismethoden, zum anderen aufgrund unterschiedlicher Ansätze bei der Auswertung und Interpretation der Hybridisierungsergebnisse zu diskutieren.

In der vorliegenden Studie wurde mittels einer Zweifarben-FISH bei 18% der ösophagealen Adenokarzinome eine Amplifikation im Bereich des HER2-Genlokus nachgewiesen. In den publizierten Veröffentlichungen der anderen Studiengruppen betragen die HER2-Amplifikationsraten 15%, 19% bzw. 35% [5, 19, 134]. Somit liegen die Daten unserer Untersuchung in der Größenordnung der Mehrzahl der anderen publizierten Studien. Bezüglich der Auswertung wurde sich bei der vorliegenden Arbeit an das Protokoll der Firma Vysis gehalten. Dieses wird zur Standardevaluierung bei Mammakarzinomen verwendet, um geeignete Patientinnen für die Herceptin-Therapie auszuwählen. Das Protokoll sieht die Auszählung von 60 Zellkernen im Tumorareal vor. In den anderen Studien wurden 40 Zellkerne [19] gezählt bzw. das komplette Tumorareal [5, 134] ausgewertet. In Abhängigkeit von der verwendeten in-situ-Hybridisierungsmethode gibt es verschiedene Definitionen der HER2-Genamplifikation. In der vorliegenden Studie und bei Walch et al. [134] wurde parallel mit der rot-markierten HER2-Sonde eine grün-markierte Chromosom-17-spezifische Alpha-Satellitensonde verwendet. Das Verhältnis der HER2-Genkopienanzahl zur Anzahl der Chromosom-17-Zentromerkopien wird als Amplifikationsrate angegeben. Per definitionem besteht eine Amplifikation bei einem Verhältnis (Ratio) > 2 . Bei diesem Auswertungsschema wird der Ploidiegrad des Tumors bzw. der Aneusomiegrad des Chromosoms 17 berücksichtigt. Hingegen wird bei Verwendung einer singulären HER2-Sonde die absolute Anzahl an HER2-Signalen verwendet und das Auftreten von ≥ 4 HER2-Signalen/Nukleus als HER2-Amplifikation definiert [19]. Nachteilig bei dieser Auswertung ist, dass Lokus-spezifische Amplifikationen nicht von einer Chromosom-17-Aneusomie unterschieden werden können. Da Adenokarzinome des Ösophagus chromosomal instabile Tumoren sind, bei denen vermehrt aneuploide und tetraploide Zellpopulationen nachgewiesen wurden [17, 50], scheint bezüglich der Aussage über die HER2-Amplifikation

4. Diskussion

eines Tumors die zusätzliche Evaluierung des Chromosom 17-Status von entscheidender Bedeutung. In unserer Studie lag unabhängig vom HER2-Amplifikationsstatus bei fast allen Tumoren eine Aneusomie des Chromosoms 17 vor. Folglich sind Aussagen über die spezifische HER2-Genamplifikation bei einem Großteil ösophagealer Adenokarzinome bei Verwendung einer HER2-Sonde ohne interne Kontrolle für Chromosom 17 kritisch zu werten. Ausgenommen sind sogenannte "high level"-amplifizierte Tumoren. Bei diesen Tumoren sind ≥ 10 HER2-Signale / Zellkern präsent und wie aus Tabelle 3.1 (Kapitel 3.1.5) ersichtlich ist, sind diese Tumoren bei Bestimmung der HER2-Ratio immer amplifiziert. Das bedeutet, dass eine HER2-Genkopienanzahl ≥ 10 Signalen / Zellkern unabhängig vom Chromosom 17 Status immer eine HER2-Genamplifikation darstellt. Hingegen sind Präparate der Kategorie "low level"-Amplifikation (n=23) kritisch zu werten. In unserer Studie gehörten 61 % (14/23) der nicht-amplifizierten und lediglich 39% (9/23) der HER2-amplifizierten Tumoren zu dieser Gruppe (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.5). Der Chromosom 17-Status ist bei dieser Gruppe, die zahlenmässig die meisten Tumoren inkludiert, hinsichtlich einer Aussage über den HER2-Status von entscheidender Bedeutung.

Ein weiterer wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist die Abweichung der mittleren chromosomalen Kopienzahl zu Werten $< 2,0$ bei Schnittpräparaten. In den Abbildungen 3.1 und 3.2 ist dieses Phänomen gut zu sehen. Ursächlich dafür ist die Bearbeitung der eingebetteten Tumorproben. Die Zellkerne werden bei der Herstellung der Gefrierschnitte beschädigt, so dass eine falsch niedrige Signalanzahl in den abgeschnittenen Zellkernen resultiert. Da lediglich eine Tumorprobe der durchschnittlichen Chromosom 17-Anzahl von gesundem Gewebe entsprach, ist davon auszugehen, dass alle übrigen Tumorpräparate Aneusomien von Chromosom 17 aufwiesen und daher bei Fehlen entsprechender Kontrollen, Aneusomien fälschlicherweise als Amplifikationen gewertet werden könnten. Dies bekräftigt nochmals die Notwendigkeit der gleichzeitigen Kohybridisierung mit einer Chromosom 17-Sonde.

4. Diskussion

Chromosomale Analysen an etablierten Krebszelllinien zeigten, dass amplifizierte Onkogene entweder in Form von extrachromosomalen "Double Minute Chromosomes" (chromosomenähnlichen Strukturen ohne Zentromere) oder in ausgedehnten intrachromosomalen Regionen, den so genannten "Homogeneously Stained Regions" vorliegen können [4, 104]. Untersuchungen an Mammakarzinom-Zelllinien ergaben, dass amplifizierte HER2-Gene vorwiegend in Chromosomen integriert sind, extrachromosomale Lokalisationen hingegen seltener auftreten [66]. Bei Interphase-FISH-Analysen zeigen sich "Homogeneously Stained Regions" als konfluierende Signale in Form von Clustern. Ein solches Bild zeigte sich auch bei den von uns untersuchten ösophagealen Adenokarzinomen (Abbildung 3.3 B). Offensichtlich tritt diese Amplifikationsform "Homogeneously Stained Region" nicht nur bei Mammakarzinomen, sondern auch bei Ösophaguskarzinomen am häufigsten auf. Vermutlich sind initial multiple Kopien sehr langer Sequenzen auf einem einzigen Chromosom amplifiziert. Im Verlauf der Progression kommt es dann zur Formation kondensierter Gencluster, die auch zu anderen Chromosomen transloziert werden können [112, 123].

Interessanterweise traten auch bei 20% der nicht-amplifizierten Tumoren vereinzelt Cluster auf. Diese Beobachtung zeigt, dass auch bei diesen Adenokarzinomen Tumorzellen mit HER2-Amplifikation existent sind. Die biologische Bedeutung solcher vereinzelt vorkommender amplifizierter Zellen kann durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden. In der gegenwärtigen Literatur gibt es keine Hinweise, ob singuläre HER2-amplifizierte Zellen ein aggressiveres Potential des Tumors bedingen. Jedoch wurde bei Mammakarzinom-Patientinnen beobachtet, dass einige HER2-negative Primärtumore im Verlauf ihrer Metastasierung mit erhöhten HER2-Serumkonzentrationen und HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen einhergehen können [79]. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass es zu einer klonalen Selektion HER2-positiver Tumorzellen im Primärtumor kommen kann, welche aufgrund ihres erhöhten malignen Potentials im Verlauf der Tumورprogression expandieren und metastasieren [79].

4. Diskussion

4.2 p185-Überexpression beim Adenokarzinom des Ösophagus

Wenn der genetische Defekt (d.h. die Amplifikation) zur verstärkten Expression des Wachstumsfaktorrezeptors führt, kann dies ein Ansatzpunkt für eine Therapie mit einem gegen HER2 gerichteten Antikörper darstellen.

Tabelle 4.2: p185-Überexpression beim Adenokarzinom des Ösophagus.

Autoren	Anzahl Tumoren	Gewebe-fixation	Antikörper (Verdünnung/ Konzentration)	p185-Überexpression
Kim [68]	10	Paraffin	GF-10 (1:100)	10%
Flejou [48]	66	Paraffin	A0485 (1:200)	11%
Nakamura [89]	80	Paraffin	NCL-CB-11 (1:20)	19%
Hardwick [55]	31	Paraffin	NCL-CB-11 (1:40)	26%
Hardwick [56]	127	Paraffin	NCL-CB-11 (1:40)	23%
Duhaylongsod [43]	42	Paraffin	p-AB-2 (1µg/ml) TAB (2, 5µg/ml)	43%
Walch [134]	35	Paraffin	A0485 (1:400)	57%
Al Kasspoles [5]	13	Frischgewebe	9G6 (3µg/ml)	60%
Friess [49]	39	Paraffin	Keine Angabe	64%
Jankowski [62]	15	Frischgewebe	NCL-CB-11, TA 1 (keine Angabe)	73%

4. Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren keine aussagefähigen Daten vorhanden, die eine direkte Kausalität zwischen HER2-Genamplifikation und Überexpression des HER2-Genproduktes p185 beim Adenokarzinom des Ösophagus beschrieben. Hinsichtlich des Nachweises der p185-Überexpression beim ösophagealen Adenokarzinom gab es nur wenige Publikationen, die zudem eine starke Diskrepanz bezüglich der Überexpressionshäufigkeit aufwiesen. In der Zwischenzeit sind deutlich mehr Studien zur p185-Expression veröffentlicht. Die Resultate sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Als ursächlich für die Spannweite der p185-Expression beim Adenokarzinom des Ösophagus (10 - 73%) sind analog zur Bestimmung der HER2-Amplifikation wiederum Unterschiede im Studiendesign, sowie methodologische Varianzen (Antikörper, Färbemethoden, Gewebefixierungen) zu diskutieren.

In unserer Studie zeigten die Tumoren ein heterogenes Immunreaktivitätsmuster mit zirkulären, membranständigen und diffusen, zytoplasmatischen Färbungen. Im Hinblick auf eine mögliche Therapie mit dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ist ausschließlich die membranäre Expression von p185 von Bedeutung. Hinsichtlich der Bedeutung der diffusen zytoplasmatischen p185-Expression existieren zwei Hypothesen:

- 1) Da die Proteinsynthese in den Ribosomen stattfindet, detektiert der Antikörper zytoplasmatische Vorläufer des endgültigen Produktes [61]
- 2) Die zytoplasmatische Färbung repräsentiert extrazelluläre Domänenfragmente, die durch das native HER2-Protein sezerniert werden [62].

Da der zytoplasmatischen HER2-Expression keine prognostische Bedeutung beigemessen wird [32, 62] und diese auch keine Zielstruktur für eine Antikörpertherapie repräsentiert, wurde sie in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist, dass die Expression beider Proteindomänen (interne und externe Domäne) an Serienschnitten untersucht wurde. Während mit dem polyklonalen Hasen-Antikörper A0485 die intrazelluläre Domäne detektiert wurde, diente die Verwendung des monoklonalen Maus-Antikörpers TAB250 der Darstellung der extrazellulären Domäne. Die

4. Diskussion

Überexpressionsrate von p185 betrug Antikörper-abhängig 51% (A0485) bzw. 34% (TAB250). Worauf die unterschiedliche Expressionshäufigkeit von intra- und extrazellulärer Domäne des Rezeptorproteins zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht geklärt werden, bietet aber einen interessanten Aspekt für potentielle Nachfolgestudien. Eine entscheidende Aussage ist jedoch, dass bei Tumoren mit starker HER2-Amplifikation (bis auf eine Ausnahme) sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Domäne von p185 stark überexprimiert sind. Dies bedeutet, dass - analog zum Mammakarzinom - der genetische Defekt in Form der Genamplifikation zu einer stark erhöhten Membranexpression des Wachstumsfaktorrezeptors beim ösophagealen Adenokarzinom führt.

Ein weiterer Punkt, der durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden konnte, ist die wesentlich höhere Rate stark überexprimierender Tumoren verglichen mit der Frequenz HER2-amplifizierter Tumoren. Als 1987 erstmalig Gewebe von Patientinnen mit Mammakarzinom hinsichtlich einer HER2-Amplifikation und p185-Expression analysiert wurde, fiel eine direkte Korrelation zwischen Genamplifikation und Überexpression auf [110]. Jedoch basierten nicht alle überexprimierten Tumore auf einer HER2-Amplifikation. In ca. 10% der Fälle war ein "single-copy-gene" für die p185-Überexpression verantwortlich [110, 111].

Da dieses Phänomen der erhöhten Proteinüberexpression ohne assoziierte Genamplifikation auch in unserer Studie aufgetreten ist, bieten sich mehrere Erklärungsansätze an:

1. Die Sensitivität des immunhistochemischen Nachweises von p185 ist wesentlich höher als die Spezifität.
2. Bei ösophagealen Adenokarzinomen gibt es amplifikationsunabhängige Aktivierungen der p185-Expression, z.B. durch aktivierende Mutationen oder epigenetische Veränderungen.
3. Eine Aneuploide bzw. Aneusomie des Chromosoms 17 führt zu einer Gendosiserhöhung, welche zu einer p185-Überexpression führt.

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Aneusomie des Chromosoms 17 zu moderat erhöhten Konzentrationen an HER2-mRNA und zu

4. Diskussion

einer Überexpression von p185 führt [134]. In unserer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Aneusomie von Chromosom 17 und der p185-Überexpression beobachtet werden, so dass unseres Erachtens der dritte Punkt der genannten Erklärungsansätze vermutlich keine Ursache einer erhöhten Expressionsrate darstellt.

4.3 Korrelation des HER2-Status mit klinisch-pathologischen Parametern

Korrelationen des HER2-Status mit klinisch-pathologischen Parametern können Hinweise auf die biologische Bedeutung des Onkogens in der Tumordprogression ösophagealer Adenokarzinome geben, beispielsweise wenn die Amplifikation des Onkogens signifikant mit der Lymphknotenmetastasierung korreliert. In diesem Zusammenhang war bei der vorliegenden Arbeit die Korrelation der HER2-Genamplifikation mit den klinisch-pathologischen Parametern aussagekräftiger als die Korrelation der Überexpression. Offensichtlich stellt der Nachweis der Genamplifikation die zuverlässigere Aussage über den HER2-Status eines Tumors dar.

Die Bedeutung der Überexpression ohne Amplifikation bleibt insbesondere vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Daten bei den beiden verschiedenen Antikörpern – im Kapitel 4.2 diskutiert – unklar. Speziell die Färbung mit dem Antikörperklon A0485 könnte auf eine zu sensitive Reaktion zurückzuführen sein. Daher muss auch das Ergebnis der positiven Korrelation von p185-Überexpression [A0485] und einem weniger häufigen Auftreten lymphatischer Metastasen unter Vorbehalt interpretiert werden. Insbesondere, da ein solcher Effekt bei der Färbung mit dem Antikörperklon TAB250 nicht beobachtet werden konnte. Bei Korrelationen der p185-Überexpression mit klinisch-pathologischen Parametern wurde von anderen Arbeitsgruppen eine erhöhte Metastasierungsrate bei den p185-überexprimierenden Tumoren beschrieben [62] bzw. konnte eine positive Korrelation mit allen Parametern des TNM-Systems festgestellt werden [89].

Bei der Korrelation der Genamplifikation / Überexpression [A0485] wurde ein Trend zugunsten einer besseren Tumordifferenzierung bei HER2-positiven

4. Diskussion

Tumoren gefunden. Hierzu gibt es in den zum Ösophaguskarzinom publizierten Studien (Tabelle 4.2) keine unterstützenden Daten. Bei Mammakarzinomen konnte hingegen die Korrelation von p185-Überexpression und Tumorentdifferenzierung beobachtet werden.

Insgesamt wurden in den bislang publizierten Studien bezüglich der HER2-Amplifikation bei ösophagealen Adenokarzinomen keine signifikanten Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern beobachtet [5, 43, 48, 49, 56].

4.4 Die Bedeutung von HER2 bei der Progression ösophagealer Adenokarzinome

Um die mögliche Rolle von HER2 bei der systemischen Progression ösophagealer Adenokarzinome zu definieren, war die Anzahl der unserer Studie zur Verfügung stehenden Tumorpräparate zu gering.

Bei einem Teil der Adenokarzinome lässt sich die maligne Tumorentwicklung auf eine morphologisch definierte Vorstufe - die Barrett-Mukosa - zurückführen.

Um die HER2-Amplifikation bzw. p185-Expression in den zeitlichen Ablauf der Progression einzuordnen, d.h. zu determinieren, ob es sich um ein frühes oder spätes Ereignis in der Tumorentwicklung handelt, wurde die p185-Expression in gesunder Ösophagusk Mukosa, Barrett-Mukosa und im Adenokarzinom analysiert [5, 62]. Da ein quantitativer Anstieg der HER2-Expression von der Barrett-Mukosa zum Adenokarzinom nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass die erhöhte HER2-Proteinexpression als diagnostischer Malignitätsmarker verwendet werden kann [62]. Da bereits bei 60% der frühen Vorstufen p185-überexprimierende Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, wurde zudem vermutet, dass es sich bei der Überexpression von p185 um ein häufiges und frühes Ereignis der Tumorprogression handelt [5]. Interessanterweise konnten die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Studie nicht auf die Genebene projiziert werden. Der Anteil HER2-amplifizierter Zellen betrug bei der Barrett-Mukosa 0%, bei den Adenokarzinomen 15,4% [5].

4. Diskussion

In einer anderen Studie wurde der HER2-Status auf Gen-, mRNA- und Proteinebene analysiert [134]. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Studie dargestellt.

Tabelle 4.3: Prozentualer Anteil HER2-positiver Präparate (Nachweis von HER2-Genamplifikation, m-RNA-Überexpression, Überexpression des Genproduktes p185) und Chromosom 17-Polysomie in den verschiedenen Stadien der Tumorprogression [134].

Histologischer Typ	Chromosom 17 Polysomie	HER2 Amplifikation	mRNA Überexpression	p185 Überexpression
Metaplasie	0%	0%	0%	0%
Lowgrade Dysplasie	50,0%	0%	0%	0%
Highgrade Dysplasie	38, 5%	30,8%	15,4%	30,8%
Adenokarzinom	52,0%	35,0%	35,0%	35,0%

Interessant bei den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass die HER2-Amplifikation erst nach der frühen Polyploidisierung auftritt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die genomische Instabilität eine Voraussetzung für die Entstehung und Selektion von HER2-Amplifikationen im Rahmen der Tumorprogression darstellt. Auf Grund dieser Ergebnisse ist die HER2-Amplifikation eher in ein späteres Stadium der spezifischen Tumorprogression einzuordnen. Diese These wurde auch von anderen Arbeitsgruppen favorisiert [48, 55, 56]. Bemerkenswert bei dieser Arbeit [134] ist die hohe Rate an HER2-amplifizierten

4. Diskussion

Tumoren, die von keiner der Arbeitsgruppen, welche in Tabelle 4.1 aufgeführt wurden, erhoben werden konnte.

Die initiale und wegweisende Beobachtung von Slamon et al, dass die Amplifikation des HER2-Onkogens mit einer signifikant schlechteren Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom assoziiert ist [110], beeinflusste maßgeblich die Entwicklung der ersten wirksamen zielgerichteten Tumorthapie. Der beobachtete prognostische Einfluss, welcher die Abhängigkeit der Tumorzellen von dem genetischen Defekt reflektiert, war eine wichtige Voraussetzung für eine gegen HER2 gerichtete Therapie. Dass die HER2-Genamplifikation bei ösophagealen Adenokarzinomen unabhängig vom TNM-Status eine prognostische Bedeutung besitzt, wurde bislang nur von einer Arbeitsgruppe beobachtet [19]. Jedoch muss betont werden, dass keiner der üblichen histopathologischen Faktoren, wie pT-Kategorie oder pN-Kategorie, einen prognostischen Einfluss hatte, was für aussagekräftige Korrelationsstudien mit Überlebensdaten unbedingt erforderlich ist [19]. Daher müsste ein solches Ergebnis in unabhängigen Kollektiven wiederholt gezeigt werden.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der p185-Überexpression wurden bisher diskrepante Resultate publiziert. Eine Arbeitsgruppe konnte keinen Einfluss zeigen, andere wiederum registrierten einen negativen prognostischen Einfluss [19, 48, 49,89]. Eine gänzlich gegensätzliche prognostische Bedeutung p185-überexprimierender Tumoren wurde von zwei Arbeitsgruppen festgestellt [43, 56]. Die Negativität für p185-Expression ging mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 10% einher, wohingegen die p185-Überexpression signifikant mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 55% assoziiert war [43].

Verantwortlich für die inkonsistenten Ergebnisse, die bezüglich der prognostischen Bedeutung der p185-Expression beim Adenokarzinom des Ösophagus beschrieben wurden, sind Unterschiede im Studiendesign, wie z.B. zu geringe Studiengröße (bei 70% der publizierten Arbeiten beträgt die Tumorprobenanzahl $n < 50$), keine aussagefähige Nachbeobachtungszeit oder die additive Durchführung neoadjuvanter/adjuvanter Therapien.

4.5 Schlußfolgerungen und Perspektiven

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass eine Subgruppe der Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus von einer gegen HER2 gerichteten Therapie profitieren würde. Anhand dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Genamplifikation und Überexpression des Genproduktes p185 bei dieser Tumorentität aufgezeigt.

In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde ein Teil der hier untersuchten Patienten sowie ein zusätzliches Kollektiv auf disseminierte Tumorzellen hin untersucht und diese molekulargenetisch analysiert. Hierbei zeigte sich in molekulargenetischen Einzelzelluntersuchungen eine HER2-Amplifikation bei 38% der disseminierten Tumorzellen [117]. Damit war die beobachtete HER2-Amplifikationsrate bei den disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu den Primärtumoren (18%) deutlich höher. Interessanterweise wurde bei disseminierten Tumorzellen ein starker prognostischer Einfluss der HER2-Amplifikation nachgewiesen. Eine HER-2-Amplifikation bei den Primärtumoren hatte dagegen keinen prognostischen Einfluss. Ein weiterer interessanter Aspekt war, dass die HER2-Amplifikationsrate disseminierter Tumorzellen bei ösophagealen Adenokarzinomen höher war als bei disseminierten Tumorzellen, die bei Patientinnen mit Mammakarzinomen isoliert wurden [117]. Folglich würden mehr Patienten mit ösophagealen Adenokarzinomen von einer adjuvanten, gegen HER2 gerichteten Therapie profitieren, als Patientinnen mit Mammakarzinom. Zusammenfassend weisen die vorliegenden präklinischen Daten auf einen Nutzen von gegen HER2 gerichteten Therapien bei ösophagealen Adenokarzinomen hin. Da bei Mammakarzinom-Patientinnen in der adjuvanten Situation bereits positive klinische Erfahrungen mit dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) gewonnen werden konnten, würde die Durchführung klinischer Studien bei Ösophaguskarzinom-Patienten eine therapeutische Bereicherung darstellen. In Hinblick auf die Ergebnisse, die bei disseminierten Tumorzellen gewonnen wurden, bleibt die Frage, ob das Kompartiment Primärtumor zur Selektion von Patienten für eine solche Therapie ein geeigneter Surrogatmarker

4. Diskussion

ist. Eine solche Fragestellung kann jedoch definitiv nur mit einer prospektiven klinischen Behandlungsstudie beantwortet werden, die aus Sicht der betroffenen Patienten wünschenswert wäre.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adam A, Ellul J, Watkinson AF (1997):** Palliation of inoperable esophageal carcinoma: a prospective randomized trial of laser therapy and stent place-ment. *Radiology* 202: 344-8
2. **Adler RH (1963):** The lower esophagus lined by columnar epithelium. Its association with hiatal hernia, ulcer, stricture and tumor. *J Thoracic Cardio-vasc Surg* 1963; 13: 45
3. **Akiyama T, Sudo C, Ogawara H (1986):** The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232: 1644-1646
4. **Alitalo K, Schwab M (1986):** Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.* 47: 235-281
5. **Al-Kasspoles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG (1993):** Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 54: 213-219
6. **Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, DiFiore PP, Kraus MH (1995):** Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human malignancies. *Oncogene* 10: 1813-1821
7. **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

5. Literaturverzeichnis

8. **Anderson D, Koch CA, Grey L, Ellis C, Moran MF, Pawson T (1990):** Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250: 979-982

9. **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2002):** Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie - Ösophaguskarzinom

10. **Badwe RA, Sharma V, Bhansali MS, Dinshaw KA (1999):** The quality of swallowing for patients with operable esophagus carcinoma. *Cancer* 85:763-768

11. **Barrett NR (1950):** Chronic peptic ulcer of the esophagus and oesophagitis. *Br J Surg* 38: 175-182

12. **Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Emond MJ, Reid BJ (1996):** Determination of the frequency of loss of heterozygosity in esophageal adenocarcinoma by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 12: 1873-1878

13. **Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, Rabinovitch PS, Reid BJ (1999):** Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett esophagus. *Nat. Genet.* 22: 106-109

14. **Baulida J, Krauss MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996):** All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J. Biol. Chem.* 271: 5251-5257

15. **Blot JW, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF (1991):** Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Amer med Ass* 265: 1287-1289

5. Literaturverzeichnis

16. **Blot JW, Devesa SS, Fraumeni JF (1993):** Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. JAMA 270: 1320
17. **Bollschweiler E, Hölscher A.H. (2000):** Deutliche Zunahme des Adenokarzinoms im Ösophagus. Dt Ärztebl; 97: A-1896-1900 [Heft 27]
18. **Bosse A:** Pathomorphologie des Ösophaguskarzinoms. In: Zoller WG, Köppen U (Hrsg.): Das Ösophaguskarzinom - Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, 2002, S. 28-35
19. **Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS (2000):** HER2/neu gen amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. Hum Pathol 31: 35-39
20. **Brito M, Filipe MI, Linehan J, Jankowski J (1995):** Transforming growth factor α expression in gastro-oesophageal tumorigenesis may reflect altered processing of the precursor peptide. Int. J. Cancer 60: 27-32
21. **Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WR, Zipursky SL, Hafen E (1994):** A gain-of-function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. Cell 76: 875-888
22. **Buday L, Downward J (1993):** Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb 2 adapter protein and Sos nucleotide exchange factor. Cell 73: 611-620
23. **Burden S, Yarden Y (1997):** Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. Neuron 18: 847-855

5. Literaturverzeichnis

24. **Canto MI, Smith C, Mc Clelland L (2002):** Randomized trial of PDT vs. stent for palliation of malignant dysphagia: cost-effectiveness and quality of life. *Gastrointest Endosc* 55: Suppl:AB100.abstract
25. **Castell DO (1975):** The lower esophageal sphincter. Physiologic and clinical aspects. *Ann. Intern. Med.* 83: 390-401
26. **Chen X, Levkowitz G, Tzahar E, Karunagaran D, Lavi S, Ben-Baruch N, Leitner O, Ratzkin BJ, Bacus SS, Yarden Y (1996):** An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/herregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4. *J Biol Chem* 271: 7620-7629
27. **Cho HS, Leahy DJ (2002):** Structure of the extracellular region of HER3 reveals a interdomain tether. *Science* 297, 1330-1333
28. **Cho HS, Mason K, Ramxar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr. DW, Leahy DJ (2003):** Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with Herceptin Fab. *Nature* Vol 421: 756 - 759
29. **Clark GWB (2003):** Effect of *Helicobacter pylori* infection in Barrett's esophagus and the genesis of esophageal adenocarcinoma. *World J. Surg.* 27: 994-998
30. **Cohen JA, Weiner DB, More KF, Kokai Y, Williams WV, Maguire HC, LiVolsi VA, Greene MI (1989):** Expression pattern of the neu (NGL) gene encoded growth factor receptor protein (p185^{neu}) in normal and transformed epithelial tissues of the digestive tract. *Oncogene* 4: 81-88
31. **Cohen BD, Green JM, Foy L, Fell HP (1996):** HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271: 4813-4818

32. **Corbett IP, Henry JA, Angus B, Watchorn CJ, Wilkinson L, Henessy C (1990):** NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognising the internal domain of the c-erbB2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J. Pathol.* 161: 15-25
33. **Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, 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
34. **Crabb DW, Berk MA, Hall TR, Conneally PM, Biegel AA, Lehman GA (1985):** Familial gastroesophageal reflux and development of Barrett's esophagus. *Ann Intern Med* 103: 52-54
35. **Crone, SA (2002):** ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature Med.* 8, 459-465
36. **Dallal HJ, Smith GD, Grieve DC, Ghosh S, Penman ID, Palmer KR (2001):** A randomized trial of thermal ablative therapy versus expandable metal stents in the palliative treatment of patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 54: 549-57
37. **Dallinga JW, Pachen DMFA, Lousberg AHP, Geel JAM van, Houben GMP, Stockbrugger RW (1998):** Volatile N-nitrosamines in gastric juice of patients with various conditions of the gastrointestinal tract determined by gas chromatography-mass spectrometry and related to intragastric pH and nitrate and nitrite levels. *Cancer Lett.* 124: 119-125

5. Literaturverzeichnis

38. **Daly JM, Fry WA, Little AG (2000):** Esophageal Cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study. *J Am Coll Surg* 190: 562-572
39. **Dekken H van, Vissers CJ, Tilanus HW, Tanke HJ, Rosenberg C (1999):** Clonal analysis of a case of multifocal oesophageal (Barrett's) adenocarcinoma by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.* 188: 263-266
40. **Deutsches Ärzteblatt (2002):** Auf dem Weg zur Zivilisationskrankheit - Medizinreport Barrett-Karzinom des Ösophagus. *Dt Ärztebl*, Jg. 99, Heft 20
41. **Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF (1998):** Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83: 2049-2053
42. **Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA (1987):** ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH 3T3 cells. *Science* 237: 178-182
43. **Duhaylongsod FG, Gottfried MR, Iglehart JD, Vaughn AL, Wolfe WG (1995):** The significance of c-erbB-2 and p53 immunoreactivity in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg* 221: 677-684
44. **El-Serag HB (2002):** The epidemic of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin N Am* 31, 421-440
45. **Eng C, Spechler SJ, Ruben R, Li FP (1993):** Familial Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2: 397-399

5. Literaturverzeichnis

46. **Enzinger PC, Mayer RJ (2003):** Esophageal cancer. *N Eng J Med* 349, 23:2241
47. **Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G (1998):** Recent developments in the molecular characterization of Barrett's esophagus. *Dig dis* 16: 63-80
48. **Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, Fekete F, Henin D, Jothy S, Potet F (1994):** Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: Pathological and prognostic correlations. *J Clin Pathol* 47: 23-26
49. **Friess H, Fukuda A, Tang W-H, Eichenberger A, Furlan N, Zimmermann A, Korg M, Büchler MW (1999):** Concomitant analysis of the epidermal growth factor receptor family in esophageal cancer: overexpression of epidermal growth factor receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. *World J Surg* 23: 1010-1018
50. **Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT, Emond MJ, Levine DS, Rabinovitch PS, Reid BJ (1996):** 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7081-7084
51. **Garrett TPJ (2002):** Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . *Cell* 110, 763-773
52. **Garrett TPJ (2003):** The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11, 495-505
53. **Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE (1995):** Single-chain antibody-mediated intracellular retention of erbB-2 impairs Neu Differentiation

5. Literaturverzeichnis

- factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1182-1191
54. **Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM (1997):** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16: 1647-1655
55. **Hardwick RH, Shepherd NA, Moorghen M, Newcomb PV, Alderson D (1995):** c-erbB-2 overexpression in the dysplasia/carcinoma sequence of Barrett's oesophagus. *J. Clin. Pathol.* 48: 129-132
56. **Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, Rahamin J, Alderson D (1997):** Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. *Eur. J. Surg. Oncol.* 23: 30-35
57. **Hsu JC, Perrimon N (1994):** A temperature-sensitive MEK mutation demonstrates the conservation of the signaling pathways activated by receptor tyrosine kinases. *Genes Dev.* 8: 2176-2187
58. **Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A (1987):** Increased expression of the putative growth factor receptor p185^{HER2} causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7159-7163
59. **Hynes NE, Stern DF (1994):** The biology of erbB-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochem Biophys Acta* 1198: 165-184
60. **Hynes NE, Lane HA (2005):** ErbB Receptors and in cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews* Vol. 5: 341-354
61. **Jaehne J, Urmacher C, Thaler HT, Friedlander-Klar H, Cordon-Cardo C, Meyer HJ (1992):** Expression of the HER2/neu oncogene product p

5. Literaturverzeichnis

- 185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. *J Cancer Res Oncol* 118: 474-479
- 62. Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, Wormsley KG (1992):** Oncogenes and onco-suppressor gene in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 33: 1033-1038
- 63. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS (1999):** Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 154: 965-973
- 64. Jenkins GJS, Doak SH, Parry JM, D`Souza FR, Griffiths AP, Baxter NJ (2002):** Genetic pathways involved in the progression of Barrett`s metaplasia to adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* 89: 824-837
- 65. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX (1999):** Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 447, 227-231
- 66. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen L-C, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992):** ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5321-5325
- 67. Kauer WK, Stein HJ (2002):** Role of acid and bile in the genesis of Barrett`s esophagus. *Chest Surg Clin N Am* 12: 39-45
- 68. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Reynolds JC (1997):** Expression of p53, PCNA and C-erbB-2 in Barrett`s Metaplasia and Adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 42, No. 12, pp.2453-2462

5. Literaturverzeichnis

69. **Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y (2000):** Biochemical and clinical implications of the erbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* :27 -79
70. **Klein CA (2003):** The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell - the unit of selection. *Adv Cancer Res* 2003; 89:35-67
71. **Kokai Y, Cohen JA, Drebin JA, Greene MI (1987):** Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8498-8501
72. **Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA (1989):** Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9193-9197
73. **Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyren O (1999):** Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 340: 825-831
74. **Lee KF (1995):** Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-395
75. **Levkowitz G, Klapper LN, Tzahar E, Freywald A, Sela M, Yarden Y (1996):** Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not no other ErbB proteins *Oncogene* 12: 1117-1125
76. **Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ (1999):** Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am. J. Med.* 106: 642-649

77. **Loffeld RJLF, Werdmuller BFM, Kuster JG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Kuipers EJ (2000):** Colonization with cagA-positive *Helicobacter pylori* strains inversely associated with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Digestion* 62: 95-99
78. **Lord RVN, Frommer DJ, Inder S, Tran D, Ward SL (2000):** Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in 160 patients with Barrett's oesophagus or Barrett's adenocarcinoma. *Aust. N. Z. J. Surg.* 70: 26-33
79. **Lüftner D, Akrivakis C, Henschke P, Fleige B, Petrides PE, Possinger K (2000):** Does an elevated serum HER2/neu level qualify breast cancer patients for Herceptin® therapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2000, 126: R 22
80. **Malthaner RA, Wong RKS, Rumble RB, Zuraw L (2004):** Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 2004, 2:35
81. **Manjunath S, Jankowski JAZ (2000):** Interaction of environmental factors in oesophageal carcinogenesis. *J R Coll Surg Edinb* 45:260-262
82. **Menke-Pluymers MBE, Drunen E van, Vissers KJ, Mulder AH, Tilanus HW, Hagemeyer-Hausman AMMJ (1996):** Cytogenetic analysis of Barrett's mucosa and adenocarcinoma of the distal esophagus and cardia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 90: 109-117
83. **Merkle P:** Chirurgische Therapie des Ösophaguskarzinoms. In: Zoller WG, Köppen U: *Das Ösophaguskarzinom - Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie.* Schattauer, 2002, S. 41-58

5. Literaturverzeichnis

84. **Moskaluk CA, Hu J, Perlman EJ (1998):** Comparative genomic hybridization of esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 305-311
85. **Morson BC, Belcher JR (1952):** Adenocarcinoma of the oesophagus and ectopic gastric mukosa. *Br J Cancer* 6: 127
86. **Müller M (2002/03):** Chirurgie für Studium und Praxis. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
87. **Muller JM, Erasmi H, Stelzner M, Zieren U, Pichelmaier H (1990):** Surgical therapy of oesophageal carcinoma. *Br J Surg* 77: 845-857
88. **Murali R, Brennan P, Kieber-Emmons T, Green M (1996):** Structural analysis of p185c-neu and epidermal growth factor receptor tyrosine kinases: oligomerization of kinase domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6252-6257
89. **Nakamura T, Nekarda H, Hoelscher AH, Bollschweiler E, Harbec N, Becker K, Siewert JR (1994):** Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus. *Cancer* 73:1785-94
90. **Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Slamon DJ, Fendly BM, Ullrich A (1990):** Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 45: 457-461
91. **Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J (1999):** Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease - influence of gastric acidity. *Gut* 44: 598-602

5. Literaturverzeichnis

92. **Padhy LC, Shih C, Coving D (1982):** Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. Cell 28: 865-871
93. **Pantel K, Brakenhoff RH (2004):** Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer 2004;4 (6):448-56
94. **Paull A, Trier JS, Dalton MD (1976):** The histologic spectrum of Barrett`s esophagus. N. Engl. J. Med. 295: 476-480
95. **Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996):** Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. EMBO J. 15: 2452-2467
96. **Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VI, Todaro GJ, Shoyab M (1990):** Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4905-4909
97. **Rahden von BHA, Stein HJ, Siewert JR (2003):** Barrett`s Esophagus and Barrett`s Cancer. Curr Oncol Rep 5: 203-209
98. **Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS (1993):** Barrett`s esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. Gastroenterology 105: 119-129
99. **Respondek M:** Therapiestrategien. In: Zoller WG, Köppen U: Das Ösophaguskarzinom - Interdisziplinäre Diagnostik und Therapie. Schattauer, 2002, S. 37-40

5. Literaturverzeichnis

100. **Riese DJ, Raaij TM van, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF (1995):** The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15: 5770-5776
101. **Riese DJ, Stern DF (1998):** Specificity within the EGF-family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20: 41-48
102. **Romero Y, Cameron AJ, Locke GR, Schaid DJ, Slezak JM, Branch CD, Melton LJ (1997):** Familial aggregation of gastroesophageal reflux in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 113: 1449-1456
103. **Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984):** The neu oncogene: an erb-B related gene encoding a 185.000 Mr tumour antigen. *Nature* 312: 513-516
104. **Schwab M, Amler LC (1990):** Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 181-193
105. **Segatto O, Pelicci G, Giuli S, Digiesi G, DiFiore PP, McGlade J, Pawson T, Pelicci PG (1993):** Shc products are substrates of erbB-2 kinase. *Oncogene* 8: 2105-2112
106. **Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T (1985):** V-erb-related protooncogene, c-erb-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6497-6501
107. **Shaheen NJ, Crosby MA, Bozymski EM, Sandler RS (2000):** Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology* 119: 333-338

5. Literaturverzeichnis

- 108. Shih C, Padhy LC, Murray M (1981):** Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature 290: 261-264
- 109. Siewert JR, Hölscher AH, Becker K, Gössner W (1987):** Kardiakarzinom: Versuch einer therapeutisch relevanten Klassifikation. Chirurg 58; 25-34
- 110. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987):** Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. Science 235: 177-182
- 111. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989):** Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244: 707-712
- 112. Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP, Stark GR (1990):** Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. Cell 63: 1219-1227
- 113. Spechler SJ, Dep. of Veterans Affairs Gastroesophageal Reflux Disease Study Group (1992):** Comparison of medical and surgical therapy for complicated gastroesophageal reflux disease in veterans. N Engl J Med 326: 786-792
- 114. Spechler SJ (2002):** Clinical practice. Barrett's Esophagus. N Engl J Med 346: 836-842

5. Literaturverzeichnis

115. **Stein HJ, Rahden BHA von, Höfler H, Siewert JR (2003):** Karzinom des ösophagogastralen Übergangs und Barrett-Ösophagus. Chirurg 74: 703-708
116. **Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986):** p185, A product of the neu proto-oncogene, is a receptor-like protein associated with tyrosine kinase activity. Mol Cell Biol 6: 1729-1740
117. **Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann C, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA (2008):** Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. Cancer Cell, 13:441-453
118. **Stoica G, Koestner A (1984):** Diverse spectrum of tumors in male Sprague-Dawley rats following single high doses of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Am J Pathol 116: 319-326
119. **Stoltoff SP, Carraway KL, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC (1994):** ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. Mol Cell Biol 14: 3550-3558
120. **Tang CK & Lippman ME** in Hormones and Signaling (ed. O`Malley BW) 113-165 (Academic, San Diego 1998)
121. **Thompson JJ, Zinsser KR, Enterline HT (1983):** Barrett`metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. Hum Pathol;14:42-61
122. **Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland.**
Statistisches Bundesamt Wiesbaden 1997

123. **Trask BJ, Hamlin JL (1989):** Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *Genes Dev.* 3: 1913-1925
124. **Trask BJ, Massa H, Kenwrick S, Gitschier J (1991):** Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA-Sequences to interphase cell nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1-15, 1991
125. **Tzahar E, Yarden Y (1998):** Mini-review - The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochem Biophys Acta* 1377 M25-M37
126. **Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1998):** A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*; 5276-5287
127. **UICC (2002):** TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz, F (Hrsg). 6.Auflage Springer
128. **Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Gray A, Tam AW, Yarden Y, Libermann TA, Sclessinger J (1984):** Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A 431 epidermoid carcinoma cells. *Nature (London)* 309, 418-425
129. **Van Dam J. (1997):** Endosonographic evaluation of the patient with esophageal cancer. *Chest* 112: Suppl: 184S-190S
130. **Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB (1995):** Obesity, alcohol and tobacco as risk factors for cancer of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4: 85

5. Literaturverzeichnis

131. **Wada T, Qian X, Greene MI (1990):** Intermolecular association of the p185^{neu} protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell* 61: 1339-1347
132. **Walch AK, Bink K, Gais P, Stangl S, Hutzler P, Aubele MM, Mueller J, Höfler H, Werner M (2000):** Evaluation of c-erbB-2 overexpression and HER2/neu gene copy number heterogeneity in Barrett's adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol* 20: 25-32
133. **Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM, Mueller J, Stein H, Braselmann H, Siewert JR, Höfler H, Werner M (2000):** Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Pathol* 156 (2): 555-566
134. **Walch AK, Specht K, Bink K, Zitzelsberger HF, Braselmann H, Bauer M, Aubele MM, Stein H, Siewert JR, Höfler H, Werner M (2001):** HER2/neu gene amplification, elevated mRNA expression and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Lab Invest* 81: 791-801
135. **Zhang K, Sun J, Liu N (1996):** Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. *J Biol Chem* 271:3884-3890

6. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Franziska Stern
Geburtstag/-ort: 15.10.1974 in Halle/Saale
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1981 - 1989 Grundschole Arthur Becker in Halle/Saale
1989 - 1993 Latina August-Hermann-Francke Sachsen-Anhalt

Ausbildung

1993 - 1995 Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin an
der Lehranstalt der Medizinischen Hochschule
Hannover

Berufliche Tätigkeit als MTLA

1996 - 2001 Chirurgisches Forschungslabor der allgemeinen und
hepatobiliären Chirurgie der Universitätsklinik
Eppendorf in Hamburg

Hochschulausbildung

April 1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universitätsklinik Eppendorf in Hamburg
August 2000 Physikum
August 2001 I. Staatsexamen
März 2004 II. Staatsexamen
April 2004 - Mai 2005 Praktisches Jahr am Städtischen Klinikum Lüneburg
in den Fächern Chirurgie - Innere Medizin - Pädiatrie
(Immatrikulation an der Universität Göttingen)
April 2005 III. Staatsexamen

6. Lebenslauf

Dissertation

- 2000-2002 Promotion in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitäts-
klinikums Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung
von Dr. med. N.H. Stoecklein
(Direktor: Prof. Dr. med. J.R. Izbicki)
- Seit 2003 Fortsetzung der Promotionsarbeit in der Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der
Betreuung von Dr. med. N.H. Stoecklein
(Direktor: Prof. Dr. med. W.T. Knoefel)

Ärztliche Tätigkeit

- 10/2005 - 06/2008 Assistenzärztin für Innere Medizin im Altmark
Klinikum Salzwedel
- Ab 07/2008 Assistenzärztin für Innere Medizin im Klinikum
Uelzen

Bad Bevensen, im Juni 2009

7. Publikationsverzeichnis

Teile der Daten der vorliegenden Promotionsarbeit konnten zu folgenden Publikationen beitragen:

Originalarbeiten

Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, **Stern F**, Hartmann C, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA: Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 2008, 13, 441-453

Buchbeiträge

Stoecklein NH, Hosch SB, **Stern F**, Petronio M, Grau R, Scheunemann P, Knoefel WT, Izbicki JR, Klein CA: Das Her-2/neu Onkogen ist eine geeignete Zielstruktur für die adjuvante Therapie disseminierter Ösophaguskarzinome. *Chirurgisches Forum* 2004, edited by Ulrich B, Jauch K-W, Bauer H. Berlin, Heidelberg, Springer, 2004, 151-152

Stoecklein NH, Hosch SB, **Stern F**, Hartmann C, Siegmund A, Scheunemann P, Knoefel WT, Verde PE, Erbersdobler A, Izbicki JR, Klein CA: Whole genome screen of single disseminated cancer cells identifies HER2 as target for adjuvant therapy in a subgroup of esophageal cancer patients, *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006, 43:1962 3. April 2006, 97th Annual Meeting of the

Stoecklein NH, Hosch SB, **Stern F**, Petronio M, Grau R, Scheunemann P, Knoefel WT, Izbicki JR, Klein CA: The HER2 oncogene is a suitable target for adjuvant therapy of disseminated esophageal cancer, *Langenbecks Archive Surg* 2004, 389:430 A4030. Oktober 2004, 8th Annual Meeting on Surgical Research / 8. Chirurgische Forschungstage 2004, Mannheim, Deutschland

Weitere Publikationen

Originalarbeiten

Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, **Stern F**, Scheunemann P, Peiper M, Eisenberger CF, Izbicki JR, Klein CA, Hosch SB: Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, J Clin Oncol 2004, 22:4685-4693

Abstracts

Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, Knoefel WT, Schraut W, Verde PE, **Stern F**, Scheunemann P, Peiper M, Eisenberger CF, Izbicki JR, Klein CA, Hosch SB: Copy Number of Chromosome 17 but not HER2 Amplification predicts Outcome of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Pancreatology 2005; 5 (suppl 1): A 14, 7. Juli 2005, 37th European Pancreas Club (EPC) Meeting, Graz, Österreich

8. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Promotionsarbeit ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Bad Bevensen, den 15. Mai 2008

9. DANKSAGUNG

Ohne die Unterstützung durch meine akademischen Lehrer, Kollegen, medizinische-technische Assistenten sowie das Verständnis und die Hilfe meiner Familie hätte ich diese Promotionsarbeit nicht in der vorliegenden Form präsentieren können. Deshalb bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Ganz besonders danken möchte ich:

Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel für die Überlassung des Themas,

Dr. Nikolas Stoecklein für die gute Betreuung und tatkräftige Unterstützung in jeder Phase der Arbeit, obwohl seine perfektionistische Einstellung, die perfekte Doktorarbeit zu erschaffen, zu unzähligen arbeitsreichen Nächten und Wochenenden führte,

Prof. Stefan B. Hosch für die guten Diskussionen,

Dr. Erbersdobler und Frau Schnöger aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Eppendorf (Hamburg) für die Hilfsbereitschaft, Techniken und Methoden der In-situ-Hybridisierung zu vermitteln,

Andreas Lübke für den humorvollen und konstruktiven Gedankenaustausch nicht nur zum Thema "In-situ-Hybridisierung",

Silke Brillhoff, die mit ihrer Hilfsbereitschaft, Kompetenz und Freundlichkeit einen wesentlichen Anteil am praktischen Gelingen dieser Arbeit hatte,

und vor allem meiner Familie, ganz besonders meinem Mann Stefan, der mir und dieser Arbeit zuliebe auf viele Dinge verzichtete, vor allem meinem Mann Stefan, sowie meiner Mutter Dr. Sylvia Stern, deren Liebe, Stärke und

9. Danksagung

Fürsorglichkeit die Basis meiner persönlichen und beruflichen Situation ist. Desweiteren möchte ich mich bei meinen Kindern Sophia und Laurin bedanken, die auf mich als aktiven Spielpartner oft verzichten mußten und hoffentlich nicht computer-süchtig werden, weil die Mutter dauernd vor dem PC saß!

10. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde der HER2-Status bei 72 Patienten mit ösophagealen Adenokarzinomen anhand serieller Gefrierschnitte bestimmt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde eine HER2-Amplifikationsrate (HER2/CEP 17-Ratio > 2) bei 17, 8% (n=13) der Adenokarzinome nachgewiesen. Aufgrund der Kohybridisierung von HER2 und Chromosom 17 konnte bewiesen werden, dass die Resultate Lokus-spezifische Alterationen repräsentieren und nicht durch eine Polysomie des Chromosoms 17 bedingt sind. Bezogen auf die durchschnittliche HER2-Genkopienzahl lag bei 69% (9/13) der amplifizierten Tumoren eine "low-level"-HER2-Amplifikation (4 - 9 HER2-Signale/Nukleus) und bei 31% (4/13) eine "high-level"-HER2-Amplifikation (≥ 10 HER2-Signale/Nukleus) vor.

Die Expression des HER2-Proteins p185 wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen. In den Färbereihen mit dem polyklonalen Antikörper A0485, welcher die intrazelluläre HER2-Domäne detektiert, zeigten 51% (37/72) der Tumoren eine Überexpression des Proteins p185 (Färbeintensität "2+", "3+"). Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers TAB250, welcher gegen die extrazelluläre HER2-Domäne gerichtet ist, wurde bei 35% (25/72) der Tumoren eine Überexpression von p185 nachgewiesen. Die Korrelation zwischen Amplifikation und Überexpression war statistisch hoch signifikant (A0485 $p=0,002$; TAB250 $p<0,001$). Bei beiden Antikörpern zeigten 12/13 amplifizierten Tumoren (92%) eine starke Überexpression ("3+"). Bei Tumoren mit Chromosom 17-Polysomie ohne HER2-Amplifikation war kein Einfluß auf die p185-Expression nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte kein prognostischer Einfluß des HER2-Status nachgewiesen werden. Insgesamt legen die Resultate jedoch nahe, dass HER2 beim ösophagealen Adenokarzinom eine geeignete Zielstruktur für eine adjuvante molekulare Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) – der bereits effektiv in der adjuvanten Therapie bei Mammakarzinom-Patientinnen eingesetzt wird – darstellt.

