

Aus dem Institut für Onkologische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. H. Bojar

**Prognostische Bedeutung der Quantifizierung der HER-2/neu Amplifikation
mit Hilfe von FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)
im Vergleich zur immunhistochemischen Bestimmung der Überexpression
bei nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Claudia Bente

2001

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bojar

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. G. Schmitt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	3
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Patientinnen.....	9
2.2 Beschreibung der multizentrischen Therapiestudien 2 und 3	9
2.2.1 Bedingungen der Teilnahme an den Studien	10
2.2.2 Fragestellungen der Studien 2 und 3	11
2.2.3 Studienablauf	12
2.3.1 Material	15
2.3.2 Vorbehandlung des Tumormaterials	17
2.3.3 Hybridisierung	17
2.3.4 Auswertung	18
2.3.5 Statistik.....	19
3. ERGEBNISSE	20
3.1 Zusammensetzung des Kollektivs.....	20
3.2 Zusammenhang zwischen HER-2/neu Kopienzahl und Expression.....	23
3.3 Zusammenhang zwischen absoluter HER-2/neu Kopienzahl und.....	24
3.4 Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate ohne Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren.....	25
3.5 Zusammenhang zwischen HER-2/neu Amplifikation und Überexpression und anderen prognostischen Faktoren.....	34
3.6 Univariate und multivariate Analyse der Effekte der anderen prognostischen Faktoren auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate	36
3.7 Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate bei Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren.....	39
4. DISKUSSION	44
6. DANKSAGUNG.....	57
7. LITERATUR.....	58

1. Einleitung

Brustkrebs macht in den westlichen Industrieländern ~ 21 % der weiblichen Malignome aus und ist somit der häufigste bösartige Tumor der Frau. Nach heutigen Inzidenzzahlen entwickelt etwa jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom, wobei in Deutschland von ca. 46.000 Neuerkrankungen pro Jahr auszugehen ist. Bei der Altersverteilung ist zu beachten, daß Inzidenz und Mortalität bis zur letzten Altersklasse ansteigen. Die häufig zu findende Aussage, der Altersgipfel liege zwischen 55 und 65 Jahren, geht von der absoluten Zahl aus und ist richtig, spiegelt aber nicht diese stetige relative Zunahme der Erkrankungshäufigkeit ab dem 4. Lebensjahrzehnt wider. Männer machen lediglich 1-2 % der Fälle aus.^{5,6} 1996 sind in Deutschland 18.876 bzw. 45,0/100.000 Frauen an Brustkrebs verstorben.

Das Mammakarzinom nimmt also unter den weiblichen Krebstodesfällen ursächlich die erste Stelle ein. Es hat sich dabei gezeigt, daß eine adjuvante Therapie insgesamt zu einer signifikanten Reduktion der jährlich auftretenden Rezidive, Metastasierungen und Todesfälle führt. In Frage kommen hierfür vor allem eine zytostatische Polychemotherapie und in der Postmenopause auch eine Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Patientinnen zu diesem Zeitpunkt entsprechend den Ergebnissen der klinischen, technischen und histopathologischen Untersuchungen tumorfrei sind. Es werden also lediglich vermutete Mikrometastasen und disseminierte Tumorzellen durch diese Therapieverfahren angegangen. Die Frage der adjuvanten systemischen Therapie des primären Mammakarzinoms wird international kontrovers diskutiert. Es profitiert nämlich nur ein Teil der Patientinnen von einer adjuvanten Behandlung, vornehmlich diejenigen mit schlechter Prognose. Das bedeutet, daß auch Patientinnen mit besserer Prognose eine zusätzliche Therapie erhalten, ohne einen Nutzen daraus zu ziehen. Hierbei ist zu bedenken, daß die Chemotherapie eine Reihe von Nebenwirkungen hat. Dazu zählen einerseits akute Toxizitäten wie Übelkeit, Erbrechen, Mukositis, Alopezie, Hämatoxizität und Zystitis und andererseits erhöht sich das Risiko, daß nach längerer Latenzzeit Zweitneoplasien, z.B. akute Leukämien auftreten.⁵ Ziel muß es also sein, eine

adäquate risikoadaptierte Therapieplanung durchzuführen. Man versucht hierbei mit Hilfe von prognostischen bzw. prädiktiven Faktoren diejenigen Patientinnen zu identifizieren, die tatsächlich von einer adjuvanten Therapie profitieren, um eine unnötige Therapie von Patientinnen zu vermeiden, die schon durch den chirurgischen Eingriff kurativ behandelt sind.⁷⁻⁹ Solche Faktoren müssen dabei sowohl auf ihre prognostische Wertigkeit, also die Stärke und Unabhängigkeit der Vorhersage für Rezidiv und Tod, als auch auf ihre prädiktive Aussage, also ihre Eignung als Indikator für Ansprechen auf oder Resistenz gegen adjuvante Therapie, geprüft werden. Durch klinische Studien sollte gezeigt werden, daß der mit einem Faktor verknüpfte ungünstige Krankheitsverlauf durch adjuvante Behandlung in Richtung einer günstigeren Prognose verändert werden kann.^{5,6}

Zu den klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren zählen Lymphknotenstatus, Sitz und Größe des Primärtumors, Tumorgrad, Tumorhistologie, Patientinnenalter, familiäre Disposition, Eintritt der Menopause und gegebenenfalls bereits erfolgte Fernmetastasierung, wobei der axilläre Lymphknotenstatus nach wie vor der wichtigste prognostische Faktor bleibt.^{5,7,17,22} In den letzten Jahren sind darüber hinaus sehr viele laborchemische, immunhistochemische und auch molekularbiologische Untersuchungen zur Etablierung weiterer Prognosefaktoren durchgeführt worden. Durchgesetzt hat sich hiervon z.B. die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus, da östrogen- und progesteronrezeptorpositive Tumore eine günstigere Prognose haben als hormonrezeptornegative Tumore und auch besser auf eine Hormontherapie ansprechen. Andere Parameter sind die Proliferationsaktivität des Tumors (S-Phase-Fraktion; Ki-67 oder MIB 1) oder der Nachweis von Mutationen im Bereich des Tumorsuppressorgens p53.¹⁷

Besondere Bedeutung kommt offensichtlich auch der Amplifikation und Überexpression des Onkogens HER-2/neu bzw. c-erbB-2 zu.

Das Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert (17q11.2-q12), in einer Region, in der noch verschiedene andere für das Mammakarzinom relevante Gene anzutreffen sind, z.B. BRCA 1, Estradiol-17 β -Dehydrogenase, nm23 und RARA (retinoid acid receptor alpha).¹⁰

Das Produkt des HER-2/neu Gens ist ein plasmamembranständiges Rezeptorprotein, das nach Glykolisierung ein Molekulargewicht von 185 kDa aufweist. Es besteht aus einer ligandenbindenden externen Domäne, einer transmembranösen Komponente und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion kommt es in der Zelle zur Phosphorylierung von Tyrosin und dann über Phosphorylierung von second messenger Proteinen zur Signaltransduktion. Dieser Vorgang ist allen Mitgliedern der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) -Familie gemeinsam, zu der auch das HER-2/neu gehört. Die EGFR-Familie besteht aus vier Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Homologien mit dem ersten Mitglied aufweisen, dem EGFR, auch HER-1 genannt. Während HER-3 und HER-4 mit NDFs (Neu differentiation factors) oder Heregulin interagieren, ist es noch nicht gelungen einen Liganden zu identifizieren, der mit hoher Affinität an das HER-2/neu Protein bindet, so daß es bisher als „orphan receptor“ (verwaister Rezeptor) galt.¹¹ Neueren Veröffentlichungen zufolge spielt das HER-2/neu eine wichtige Rolle in einem Netzwerk aus Rezeptorinteraktionen. Durch Bildung von heterodimeren Rezeptorkomplexen mit den anderen Mitgliedern der EGFR-Familie kann HER-2/neu die Signaltransduktion durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren des Stromas verlängern und verstärken.^{50,80}

Die Aktivierung des HER-2/neu Onkogens wirkt offensichtlich wachstumsstimulierend und motilitätssteigernd und spielt somit eine Rolle bei der Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen, wobei die Wirkmechanismen noch nicht vollständig erklärt werden konnten.^{11,24,42,50,89}

Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Studien zur Klärung der prognostischen Bedeutung der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression beim Mammakarzinom durchgeführt worden. Révillion et al.⁴⁹ haben bei der zusammenfassenden Betrachtung von 97 Studien, die insgesamt 22.616 Patientinnen beinhalteten, im Schnitt in 26 % der Fälle (Streubreite 5-55 %) eine Amplifikation oder Überexpression gefunden, und zwar unabhängig von der verwendeten Methode. Nur mit Hilfe der PCR (Polymerase chain reaction) kann man in einem etwas höheren Prozentsatz eine HER-2/neu Amplifikation nachweisen.

Vor allen Dingen bei den nodalpositiven Mammakarzinomatientinnen stellt die Amplifikation des Onkogens bzw. die Überexpression des Onkoproteins offensichtlich einen unabhängigen Risikofaktor bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens dar.^{42,15,27,51-59} Bei den nodalnegativen Patientinnen wird die Wertigkeit noch kontrovers diskutiert. In den meisten Studien läßt sich eine Bedeutung in diesem Kollektiv nicht verifizieren.^{42,51,53-55,60-62,15-19,34,43}

Auch die Analyse der Assoziation mit anderen, etablierten Prognosefaktoren ergibt unterschiedliche Ergebnisse. Die meisten Untersucher finden eine starke inverse Korrelation der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression mit dem Steroidhormonrezeptorstatus. In einigen Untersuchungen zeigt sich außerdem ein positiver Zusammenhang mit dem histologischen Subtyp (duktale invasive und in situ Karzinome), ungünstigem histologischen und nukleären Grad, Aneuploidy und hoher Proliferationsrate. Aufgrund dieser Assoziation mit mehreren starken Prognosefaktoren gelingt in vielen Studien der Nachweis der klinischen prognostischen Bedeutung der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression nur in den univariaten nicht jedoch in den multivariaten Analysen.⁴⁹

Außerdem kommt dem HER-2/neu Onkogen vermutlich eine Bedeutung als prädiktiver Faktor für ein schlechteres Ansprechen auf Chemo- und Hormontherapie zu. Mehrere Veröffentlichungen berichten, daß Patientinnen mit HER-2/neu amplifizierten bzw. überexprimierten Brusttumoren weniger von einer adjuvanten Chemotherapie mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil) oder von endokriner Therapie mit Tamoxifen profitieren als Patientinnen mit nicht amplifizierten bzw. überexprimierten Tumoren.^{12-16,21,24-32} De Laurentis et al. haben in einer Metanalyse der Interaktion zwischen dem HER-2/neu Status und der Antwortrate auf endokrine Therapie bei metastasierten Brusttumoren Ergebnisse erzielt, die indizieren, daß metastasierte Mammakarzinome, die HER-2/neu überexprimieren, resistent gegen endokrine Therapie sind.⁹⁰

Einigen Autoren zufolge ist die HER-2/neu Amplifikation bzw. Überexpression ein sinnvoller Marker, um Patientinnen zu identifizieren, die von einer hochdosierten, anthracyclinhaltigen Chemotherapie profitieren.¹⁷

Des Weiteren hat das HER-2/neu Rezeptorprotein in jüngerer Vergangenheit Bedeutung als Angriffspunkt für neuere Therapieformen des fortgeschrittenen Mammakarzinoms gewonnen. Der monoklonale Anti-HER/2-Antikörper Trastuzumab oder rhuMAB (Herceptin[®]) inhibiert in vitro und in Tierversuchen die Proliferation von humanen Tumorzellen, die HER-2/neu überexprimieren.⁶⁴⁻⁶⁷ Bezüglich des Mechanismus über den rhuMAB die HER-2/neu vermittelten Proliferationssignale unterbindet gibt es zwei Hypothesen: Entweder kommt es durch die Bindung des Antikörpers an die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu zu einer Internalisierung der Rezeptorproteine und somit zu einer Downregulation oder zu einer antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität, wobei aktivierte NK-Zellen (Natural Killer-Zellen) die überexprimierte Tumorzelle zerstören. Herceptin[®] wurde in klinischen Studien sowohl alleine als auch in Kombination mit einer Chemotherapie zur Therapie von metastasierten, HER-2/neu überexprimierten Mammakarzinomen eingesetzt und verlängerte dabei die Latenz bis zur Tumorprogression und erhöhte die Antwortrate auf die Chemotherapie.⁶⁸⁻⁷⁰ Herceptin[®] ist seit September 2000 zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms zugelassen.

Das Problem vieler Untersuchungen sind zu geringe Patientenzahlen und zu kurze Nachbeobachtungszeiten, so daß letztendlich keine verlässlichen Aussagen zur Bedeutung des HER-2/neu möglich sind.³³ Erforderlich sind in diesem Zusammenhang prospektive randomisierte Studien, die ausreichend große Patientenkollektive aufweisen und eine genügend lange Nachbeobachtungszeit gewährleisten.

Im Rahmen der prospektiven, multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* wurden im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. H. Bojar) bereits immunhistochemische Untersuchungen der HER-2/neu

Überexpression an paraffineingebettetem Tumormaterial durchgeführt. Diese bestätigen die Bedeutung des HER-2/neu als starker unabhängiger Prognosefaktor bei CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen.³⁵

In dieser Arbeit wird an einem Kollektiv von 205 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen, die postoperativ jeweils 3 oder 6 Zyklen CMF erhielten, zusätzlich zur immunhistochemischen Bestimmung der HER-2/neu Proteinexpression eine Analyse der HER-2/neu Amplifikation mit Hilfe von FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) vorgenommen. FISH ist einer der neueren methodischen Ansätze zur gezielten Detektion spezifischer Genomabschnitte und einzelner Gene in Interphasekernen von histomorphologisch erhaltenem Tumormaterial. Auf diese Weise kann eine Quantifizierung der HER-2/neu Genkopienzahl in den Mammakarzinomzellen vorgenommen werden.

Wir haben die prognostische Stärke beider Methoden in bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben verglichen, um herauszufinden, ob die Analyse der Amplifikation eine zusätzliche Information zur Bestimmung der Proteinexpression bedeutet.

2. Material und Methoden

2.1 Patientinnen

Die Bestimmung der Amplifikation des HER-2/neu Onkogens mit Hilfe von FISH wurde an einem Teilkollektiv von 205 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen aus den multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* durchgeführt. Die Beschränkung auf dieses Teilkollektiv beruhte darauf, daß dem Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nur von diesen Patientinnen das Tumormaterial in Paraffinblöcken zur Verfügung stand und an demselben Kollektiv bereits die immunhistochemische Analyse der HER-2/neu Expression vorgenommen worden ist.

2.2 Beschreibung der multizentrischen Therapiestudien 2 und 3

Zum Thema adjuvante Therapie des operierten Mammakarzinoms gibt es eine Vielzahl von Studien und Publikationen. Als Erfolg der adjuvanten Therapie kann dabei die Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit angesehen werden, wohingegen die Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit und die Erhöhung der Heilungsrate noch in der Diskussion sind. Problematisch ist, daß Metastasen, die im Verlauf einer Chemotherapie auftreten, schlechter zu therapieren sind als bei nicht vorbehandelten Mammakarzinomen. Gegner der adjuvanten Therapie bemerken hierzu, daß eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit auf Kosten einer Verkürzung der Phase der klinisch manifesten Metastasierung geht, so daß sich die Gesamtüberlebenszeit also nicht entscheidend ändert. Noch umstrittener als die adjuvante Chemotherapie ist die postoperative Nachbestrahlung des Mammakarzinoms. Als gesichert wird dabei die Verringerung der Anzahl lokoregionärer Rezidive angesehen, eine Verbesserung der Heilungsrate kann jedoch nicht bewiesen werden.

Im März 1984 wurden in der damaligen Bundesrepublik Deutschland die Therapiestudien 2 und 3 der *GBSG* begonnen, um entsprechende Therapieeffekte und Einflüsse verschiedener adjuvanter Therapieformen bei den nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen nachzuweisen. Es handelt sich hierbei um multizentrische, kooperative Studien deutscher Kliniken zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse beim Mammakarzinom. Dieses Forschungsvorhaben wurde vom BMFT (Bundesministerium für Forschung und Technologie) unterstützt. Die teilnehmenden Kliniken konnten sich für eine der beiden Studien entscheiden und diese nach Zustimmung mit ihren Patientinnen durchführen.¹⁻⁴

2.2.1 Bedingungen der Teilnahme an den Studien

In die Studien konnten Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom nach Mastektomie mit Axilladisektion aufgenommen werden. Die weiteren Ein- und Ausschlußkriterien können Tabelle 1 und 2 entnommen werden.¹⁻³

Einschlußkriterien

- klinisches Stadium T_{1a-3a} N⁺ M₀
- histologisch gesichertes invasives Mammakarzinom
- Zustand nach Mastektomie mit Axilladisektion
- mindestens 6 Lymphknoten im Operationspräparat bei Aufarbeitung durch Pathologen auffindbar
- Zustimmung der Patientin zur Aufnahme in die Studie

Tabelle 1: Einschlußkriterien für die randomisierten *GBSG*-Studien 2 und 3

Ausschlußkriterien

- nicht protokollgemäße CMF-Basistherapie
- keine Zustimmung zur Randomisation
- inflammatorisches Mammakarzinom
- nicht karzinomatöse Neoplasien der Mamma
- simultanes oder sequentielles Mammakarzinom der Gegenseite
- gleichzeitig bestehende bösartige Neubildungen anderer Organe
- Schwangerschaft oder Laktation
- klinisch nachweisbare Fernmetastasen
- fehlender Hormonrezeptorstatus
- Beginn der adjuvanten Therapie später als 36 Stunden post operationem
- sonstige vitale Gegenindikationen (Dialysepatientin, Kreatinin-clearance unter 50% der Norm, Dauer-Markumarisierung)
- Karnofsky-Index unter 60%

Tabelle 2: Ausschlußkriterien der randomisierten GBSG-Studien 2 und 3

2.2.2 Fragestellungen der Studien 2 und 3

In der Studie 2 (Chemo-Hormon-Therapiestudie) sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Kann durch eine Verlängerung der Chemotherapie die Wirkung verbessert werden?
- Kann durch zusätzliche Gabe eines Antiöstrogens die Wirkung einer Chemotherapie verbessert werden?
- Hat eine kombinierte Chemo-Hormon-Therapie im Vergleich zu den einzelnen Komponenten eine additive, supra- oder subadditive Wirkung?

Es wurde dabei eine Aufteilung der Studienpatientinnen auf verschiedene Therapiearme vorgenommen, die jeweils 3 oder 6 Chemotherapiezyklen mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil) beinhalteten. Bei einem Teil der Patientinnen wurde noch zusätzlich eine Hormontherapie mit Tamoxifen (TAM) durchgeführt.

3 x CMF	6 x CMF
3 x CMF + TAM	6 x CMF + TAM

Es handelte sich bei diesem Ansatz um einen 2 x 2-faktoriellen Versuchsplan, um eine gleichzeitige Beantwortung aller drei Fragestellungen zu ermöglichen. Um die erste Fragestellung zu beantworten, wurden die Gruppen 3 x CMF und 3 x CMF + TAM mit den Gruppen 6 x CMF und 6 x CMF + TAM verglichen. Für die Beantwortung der zweiten Frage wurden die Gruppen 3 x CMF und 6 x CMF mit den Gruppen 3 x CMF + TAM und 6 x CMF + TAM verglichen. Um schließlich noch Aussagen über die Art der Interaktion zwischen den beiden Komponenten zu machen, mußte die Gruppe 6 x CMF + TAM mit den übrigen drei Therapiearmen verglichen werden.

Die Fragestellung der Studie 3 (Chemo-Strahlen-Therapiestudie) lautete:

- Kann der Effekt einer adjuvanten Chemotherapie gesteigert werden, wenn die Chemotherapie mit einer nach modernsten Gesichtspunkten durchgeführten postoperativen Radiatio (RAD) kombiniert wird?

6 x CMF	6 x CMF + RAD
---------	---------------

Hier wurde eine adjuvante Chemotherapie mit CMF mit der Kombination dieser Behandlung mit einer postoperativen Bestrahlung verglichen.¹⁻⁴

2.2.3 Studienablauf

Nach erfolgter chirurgischer Primärtherapie, die als modifizierte radikale Mastektomie nach Patey mit axillärer en bloc Lymphknotendissektion durchgeführt wurde, erhielten alle Patientinnen eine Chemotherapie nach dem modifizierten CMF-Schema nach Bonadonna. Der Beginn der Behandlung sollte möglichst noch während der Operation, spätestens jedoch innerhalb von 36 Stunden nach Abschluß der Operation erfolgt sein. Studien haben ergeben, daß der Effekt der Chemotherapie besonders groß ist, wenn die Behandlung frühzeitig bei maximaler Tumorreduktion begonnen wird. Die Patientinnen erhielten

500 mg/m² KO (Körperoberfläche) Cyclophosphamid, 40 mg/m² KO Methotrexat und 600 mg/m² KO Fluoruracil am 1. und 8. Tag. Es schloß sich eine Therapiepause bis zum einschließlich 28. Tag an, dann erfolgte der 2. und nach einer weiteren Therapiepause schließlich der 3. Chemotherapiezyklus. Erst nach dem 3. Zyklus erfolgte die Randomisation.

Die verschiedenen Therapiearme der Studie 2 sahen folgendermaßen aus:

- 3 CMF-Zyklen ohne weitere Therapie (CMF-Basistherapie)
- 3 weitere CMF-Zyklen nach der CMF-Basistherapie
- Tamoxifen-Therapie nach der CMF-Basistherapie
- 3 weitere CMF-Zyklen und Tamoxifen-Therapie nach der CMF-Basistherapie

Nach Zuordnung der Patientin zu einer der Gruppen, wurde die entsprechende weitere Therapie durchgeführt. In den beiden Tamoxifen-Behandlungsgruppen erhielt die Patientin für die Dauer von 2 Jahren jeweils 3 x 10 mg Tamoxifen täglich.

Die Behandlungsstrategie der Studie 3 sah die Randomisation bereits nach dem 2. Chemotherapiezyklus vor. Die adjuvante Therapie begann mit 2 CMF-Schemata in der oben angegebenen Dosierung. 14 Tage später begann die postoperative Strahlentherapie, die ebenfalls protokollgerecht durchgeführt wurde. Bestrahlt wurden die Thoraxwand (Referenzdosis in 1 cm: 50 Gy (Gray) in 5 Wochen), die Parasternalregion (Referenzdosis in 3 cm: mindestens 44 Gy in 4-6 Wochen), die Axilla (berechnet auf die Mitte: bis 50 Gy in 5 Wochen) sowie das supra- und infraklavikuläre Axillafeld (Referenzdosis in 4 cm: 44 Gy in 4-6 Wochen). 2 Wochen nach Abschluß der Strahlentherapie wurde die Chemotherapie fortgeführt mit weiteren 4 CMF-Schemata in 28 Tage-Intervallen. An die Primäroperation schloß sich die Aufarbeitung der Präparate nach entsprechenden studieninternen Vorgaben durch die Pathologen der jeweiligen Kliniken an. Die Präparate wurden vermessen und gewogen. Nach histologischer Diagnose des Mammakarzinoms an einem mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbten Schnitt, der archiviert wurde, erfolgte die weitere Verarbeitung des Tumors. Ein Teil des Materials wurde für die Rezeptoranalyse eingefroren, ein anderer Teil für weitere Untersuchungen in Paraffin eingebettet. Die Beurteilung

implizierte die histologische Klassifikation sowie das Grading des Tumors. Durch einen Referenzpathologen (Prof. Dr. Hübner, Institut für Pathologie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main) erfolgte eine Nachuntersuchung des Gewebes zur Vereinheitlichung des Gradings mit der histologischen Klassifikation. Im weiteren wurde die Steroidrezeptoranalyse wie im Studienprotokoll vorgegeben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dem methodischen Zentrum (Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Direktor: Prof. Dr. Schumacher) zugeleitet.

Die Patientinnen selbst wurden einem kontrollierten Nachsorgeprogramm unterzogen, dessen Ergebnisse ebenfalls dem methodischen Zentrum zugeführt werden, um den Therapieerfolg zu überprüfen. Die Nachsorgeuntersuchungen beinhalten in bestimmten zeitlichen Abständen Anamnese, klinische Untersuchung, Laborstatus, Röntgen-Thorax, Mammographie, Skelettszintigraphie, Leberultraschall und Karnofsky-Index. Kriterien für den Vergleich der verschiedenen Therapiearme sind die rezidivfreie Überlebenszeit, die Gesamtüberlebenszeit, die Überlebenszeit bis zur Feststellung von Fernmetastasen und die Qualität des Überlebens.¹⁻³

2.3 Durchführung der eigenen Untersuchungen

2.3.1 Material

Superfrost-Objektträger

Entparaffinieren

Xylol

100 % Ethanol

96 % Ethanol

80 % Ethanol

70 % Ethanol

Aqua dest.

Puffer für die Vorbehandlung
in der Mikrowelle

10 mM tri-Na-Citrat-Puffer pH 6

enthält: 14,7 g tri-Na-Citrat

ad 5000 ml Aqua dest.

mit ~21 ml 1 N HCl auf pH 6

eingestellt

Dehydrierung

70 % Ethanol

80 % Ethanol

96 % Ethanol

Co-Hybridisierung

1,5 µl α -Satelliten-17 Sonde (Biotin
markiert) (Oncor[®])

30 µl HER-2/neu Sonde (Digoxigenin
markiert) (Oncor[®])

Waschvorgang nach der Hybridisierung	<p>1 x SSC-Lösung</p> <p>20 x SSC-Lösung: 350,6 g NaCl 176,5 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 2000 ml Aqua dest. pH 7</p>
Spülung	<p>1 x PN-Puffer</p> <p>10 x PN-Puffer: 0,1 M Na_2HPO_4 0,1 M NaH_2PO_4 0,1 % Nonidet P40</p>
Fluoreszenz-Detektion	<p>Anti-Digoxigenin-Rhodamine/Avidin-FITC (Fertig-Lösung von Oncor[®])</p>
Gegenfärbung	<p>DAPI / Antifade: 0,233 g DABC 0,800 ml Aqua dest. 0,200 ml 1 M Tris HCl, pH 8 9 ml 86 % Glycerol 0,1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ DAPI</p>
Deckgläschen	

2.3.2 Vorbehandlung des Tumormaterials

Mit einem Mikrotom werden von dem in Paraffin eingebettetem Tumormaterial 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Diese werden dann entweder über Nacht bei 65 °C oder für 1-2 Stunden bei 90 °C im Ofen gebacken.

Vor der Hybridisierung werden die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert:

2 x 5 min. Xylol

2 x 5 min. 100 % Ethanol

2 x 3 min. 96 % Ethanol

2 x 3 min. 80 % Ethanol

2 x 3 min. 70 % Ethanol

2 x 3 min. Aqua dest.

Anschließend erfolgt eine Vorbehandlung der Schnitte in 400 ml 10 mM tri-Na-Citrat-Puffer mit einem pH von 6 in der Mikrowelle über insgesamt 35 min., wobei alle 5 min. jeweils 50 ml Aqua dest. dazugegeben werden. Nach dem Abkühlen werden die Schnitte zweimal in SSC-Lösung gespült und direkt vor der Hybridisierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

2.3.3 Hybridisierung

Auf jeden Schnitt werden 5 µl des α-Satelliten-Probe 17 / HER-2/neu-Probe Gemisches pipettiert und der Schnitt mit einem Stück Plastikfolie abgedeckt. Nach der 5 minütigen Denaturierung bei 70 ± 2 °C im Ofen werden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37 °C hybridisiert.

Am nächsten Tag werden die Objektträger mit dem Tumormaterial nach Entfernung der Plastikfolie für 5 min. in 1 x SSC-Lösung in einem 72 ± 2 °C heißen Wasserbad gewaschen. Nach zweimaligem Spülen in 1 x PN-Puffer erfolgt die Detektion. Dazu werden 20 µl des Detektionsreagenz auf den Schnitt pipettiert und mit einem Stück Plastikfolie abgedeckt. Die Schnitte werden dann

für 15 min. im Dunkeln in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend noch zweimal in 1 x PN-Puffer gespült. Abschließend werden 10 µl DAPI/Antifade auf die Schnitte gegeben und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Um das Verblässen der Präparate zu verhindern, müssen diese bis zur Auswertung gekühlt und im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse erfolgt mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops am besten in einem abgedunkelten Raum.

Mit einem DAPI-Filter versichert man sich, daß der Schnitt wirklich Tumormaterial enthält, indem man die Histomorphologie mit der eines zuvor angefertigten H.E. (Hämatoxylin-Eosin) -Schnittes vergleicht.

Für die Beurteilung der Schnitte müssen bestimmte Kriterien beachtet werden: Es dürfen nur Kerne von invasiven Tumorzellen gewertet werden, die nicht überlappen. Zellkerne deren Durchmesser weniger als ein Drittel der durchschnittlichen Tumorzellgröße beträgt, dürfen nicht mitgezählt werden. Ebenso sollten mechanisch beschädigte Zellen ausgeschlossen werden, d.h. es werden nur als Tumorzellen identifizierte intakte Zellen gezählt. Ausgewertet werden jeweils 20 randomisiert ausgewählte Tumorzellen in zwei möglichst weit voneinander entfernt liegenden Tumorarealen, die die oben genannten Kriterien erfüllen.

Da die Signale aufgrund der Dicke des Schnittes nicht alle in einer Ebene liegen, ist es nötig zu fokussieren, um alle Signale zu erfassen.

Angegeben wird der Mittelwert der HER-2/neu-Signale pro Zellkern und ebenso der Chromosom 17-Signale.

2.3.5 Statistik

Die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate wurden nach der Kaplan-Meier-Methode geschätzt.⁴⁵ Sowohl die univariaten als auch die multivariaten Analysen der Effekte der prognostischen Faktoren auf die rezidivfreie und die Gesamtüberlebensrate wurden mit dem Coxschen Regressionsmodell durchgeführt.⁴⁶ Es wurden die relativen Risiken zwischen den jeweiligen Ausprägungen der prognostischen Faktoren mit dem 95 %-Konfidenzintervall geschätzt, wobei bei Variablen mit k Ausprägungen k-l 'Dummy'-Variablen verwendet wurden. Zum Test der Nullhypothese, daß der jeweilige prognostische Faktor keinen Einfluß auf die rezidivfreie und Gesamtüberlebensrate hat, wurde ein Wald-Test auf den Vektor der k-l 'Dummy'-Variablen durchgeführt.⁴⁷ Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen HER-2/neu Amplifikation bzw. Überexpression und den anderen prognostischen Faktoren wurden Mantel-Haenszel-Tests auf Trend bzw. bei der Variable Tumortyp χ^2 -Tests auf generelle Assoziation durchgeführt.⁴⁸

Die statistischen Analysen wurden von Frau Dr. C. Schmoor aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg durchgeführt (Direktor des Instituts: Prof. Dr. M. Schumacher). Die eigenen Untersuchungsergebnisse zur HER-2/neu-Amplifikation wurden, wie auch schon die immunhistochemischen Ergebnisse zur Proteinexpression, dem Institut zugeleitet und dort entsprechend den Nachbeobachtungsdaten vom Dezember 1997 analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Zusammensetzung des Kollektivs

Die Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* umfassen insgesamt 1710 Mammakarzinompatientinnen, von denen 1048 eine Beteiligung der axillären Lymphknoten aufwiesen. Da es sich bei unserem Teilkollektiv von 205 nodalpositiven Studienpatientinnen nicht um eine Zufallsstichprobe aus dem Gesamtkollektiv handelt, mußte zunächst untersucht werden, wie das Kollektiv selektioniert ist. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, daß es sich um ein prognostisch besonders günstiges oder ungünstiges Kollektiv handelt im Vergleich zu den Patientinnen, bei denen die HER-2/neu Amplifikation und Überexpression nicht analysiert wurden.

In Tabelle 3 ist die Anzahl der Patientinnen dargestellt, bei denen die HER-2/neu Genkopienzahl und Expression bestimmt wurden. Auffallend ist dabei lediglich der größere Anteil an Patientinnen der Studie 3. Ansonsten zeigen die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit (Medianes Follow-Up) und die beobachtete Anzahl an Rezidiv- und Todesfällen in dem HER-2/neu Kollektiv im Vergleich zu dem nicht untersuchtem Kollektiv keine auffälligen Unterschiede.

		HER-2/neu Genkopienzahl und Expression bestimmt	HER-2/neu Genkopienzahl und Expression nicht bestimmt
Anzahl der Patientinnen davon Studie 2 (N=720) Studie 3 (N=328)		205 (20 %) 100 (14 %) 105 (32 %)	843 (80 %) 620 (86 %) 223 (68 %)
Zielkriterium: Rezidivfreie Überlebenszeit	Medianes Follow-Up	8,4 Jahre	8,7 Jahre
	Anzahl Ereignisse	121 (59 %)	465 (55 %)
Zielkriterium: Absolute Überlebenszeit	Medianes Follow-Up	9,7 Jahre	10,1 Jahre
	Anzahl Ereignisse	107 (52 %)	407 (48 %)

Tabelle 3: Beschreibung des Kollektivs

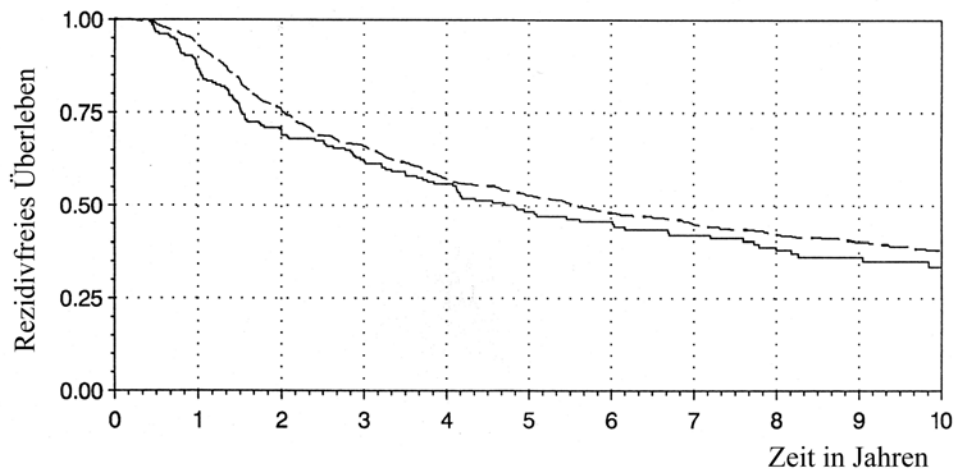
Tabelle 4 zeigt, daß die Verteilung anderer prognostischer Faktoren im HER-2/neu Kollektiv der Verteilung im nicht untersuchtem Kollektiv relativ ähnlich ist. Hinsichtlich der verschiedenen Therapiearme ist der vergleichsweise höhere

Anteil an Patientinnen mit 6 x CMF bzw. 6 x CMF + RAD in dem Kollektiv, in dem HER-2/neu bestimmt wurde, dadurch zu erklären, daß die HER-2/neu Bestimmung in größerem Umfang an Patientinnen der Studie 3 durchgeführt wurde als an Patientinnen der Studie 2.

Faktor	Ausprägung	HER-2/neu Genkopienzahl und Expression bestimmt N=205	HER-2/neu Genkopienzahl und Expression nicht bestimmt N=843
Therapie	3 x CMF	27 (13 %)	190 (23 %)
	6 x CMF	98 (48 %)	339 (40 %)
	3 x CMF + TAM	19 (9 %)	116 (14%)
	6 x CMF + TAM	17 (8 %)	103 (12 %)
	6 x CMF + RAD	44 (22 %)	95 (11 %)
Alter	≤ 40	18 (9 %)	98 (12 %)
	41-60	114 (55 %)	523 (62 %)
	> 60	73 (36 %)	222 (26 %)
Menopause	prämenopausal	75 (37 %)	359 (43 %)
	postmenopausal	130 (63 %)	483 (57 %)
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	112 (55 %)	479 (57 %)
	4-9	61 (30 %)	248 (30 %)
	> 9	30 (15 %)	111 (13 %)
Tumorgroße	≤ 20 mm	59 (29 %)	229 (28 %)
	21-30 mm	91 (44 %)	237 (40 %)
	> 30 mm	55 (27 %)	270 (32 %)
Tumorgrad	I	19 (9%)	105 (13 %)
	II	140 (68 %)	510 (61 %)
	III	46 (23 %)	215 (26 %)
Östrogen-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	122 (61 %)	496 (61 %)
	< 20 fmol/mg	79 (39 %)	321 (39 %)
Progesteron-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	108 (55 %)	477 (59 %)
	< 20 fmol/mg	90 (45 %)	334 (41 %)
Histologischer Tumortyp	solide/Kombination/andere	140 (68 %)	566 (68 %)
	lobulär	17 (8 %)	85 (10 %)
	Milchgang	26 (13 %)	88 (11 %)
	tubulär/mucinös	9 (5 %)	23 (3 %)
	medullär	13 (6 %)	69 (8 %)

Tabelle 4: Zusammensetzung des Kollektivs

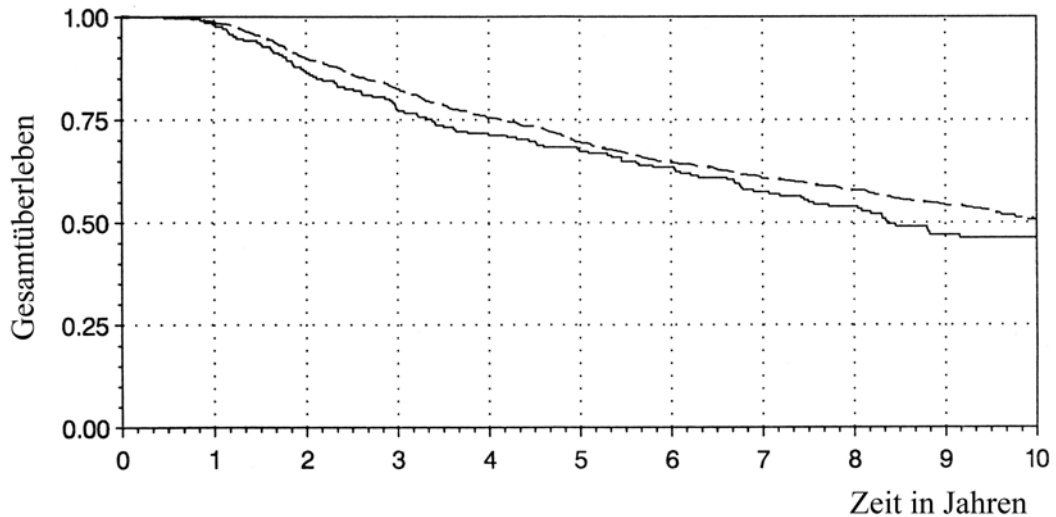
Der Vergleich der rezidivfreien Überlebensraten und der Gesamtüberlebensraten zwischen dem HER-2/neu Kollektiv und dem Kollektiv, in dem HER-2/neu nicht untersucht wurde, ergibt ebenfalls eine relativ gute Übereinstimmung. Man kann also davon ausgehen, daß es sich nicht um eine systematische Selektion handelt (Abbildung 1 und 2).



HER-2/neu	Anzahl der Patientinnen										
bestimmt	205	176	140	120	100	76	63	54	48	33	20
nicht bestimmt	843	767	609	511	428	372	315	260	209	162	105

HER-2/neu
 bestimmt
 nicht bestimmt

Abbildung 1: Vergleich der *rezidivfreien Überlebensraten* im HER-2/neu Kollektiv versus nicht untersuchtem Kollektiv



HER-2/neu	Anzahl der Patientinnen										
bestimmt	205	201	178	159	146	138	130	114	97	62	41
nicht bestimmt	843	824	748	684	624	570	525	474	417	339	231

HER-2/neu
 bestimmt
 nicht bestimmt

Abbildung 2: Vergleich der *Gesamtüberlebensraten* im HER-2/neu Kollektiv versus nicht untersuchtem Kollektiv

3.2 Zusammenhang zwischen HER-2/neu Kopienzahl und Expression

Die immunhistochemisch bestimmte HER-2/neu Proteinexpression erlaubt anhand der Färbeintensität lediglich eine Unterteilung in zwei Ausprägungen: negativ/schwach und stark. Die mit FISH untersuchte Amplifikation wird als Anzahl der Genkopien angegeben (Range 1-55; Median 3). Amplifikation wird von einigen Autoren als > 2 HER-2/neu Kopien pro Zellkern definiert. Eine neuere Arbeit, die ebenfalls FISH zur Bestimmung der HER-2/neu Amplifikation benutzte, untersuchte deren Effekt bei Einteilung der Genkopienzahl in 3 Gruppen: ≤ 2 Kopien; 3-7 Kopien; ≥ 8 Kopien¹⁸. Eine Aufteilung unserer Studienpatientinnen in diese Gruppen ergibt folgende Zahlen: ≤ 2 Kopien: 38 %; 2-8 Kopien: 33 %; ≥ 8 Kopien: 29 %. Um zusätzlich den Effekt einer sehr hohen Kopienzahl zu untersuchen, wurde für unsere Analyse die Gruppe ≥ 8 Kopien noch in zwei gleich große Gruppen mit einem Schwellenwert von ≥ 23 Kopien unterteilt. Diese Einteilungen wurden vorgenommen bevor der Einfluß auf die Zielkriterien rezidivfreie und Gesamtüberlebensrate analysiert wurde. Der in

Tabelle 5 dargestellte Zusammenhang zwischen HER-2/neu Überexpression und Amplifikation bestätigt eine sehr hohe Korrelation zwischen den beiden Faktoren. Während bei negativer/schwacher Expression nur 11 % der Mammakarzinome eine Amplifikation ≥ 8 aufweisen, sind es bei starker Expression 88 %.

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	Expression negativ/schwach	Expression stark	Summe
HER-2/neu Kopienzahl	1-2	75 (48 %)	4 (8 %)	79
	3-7	65 (41 %)	2 (4 %)	67
	8-22	13 (8 %)	16 (34 %)	29
	≥ 23	4 (3 %)	26 (54 %)	30
HER-2/neu Kopienzahl	< 8	140 (89 %)	6 (12 %)	146
	≥ 8	17 (11 %)	42 (88 %)	59
	Summe	157	48	205

Tabelle 5: Zusammenhang zwischen HER-2/neu Kopienzahl und Expression

3.3 Zusammenhang zwischen absoluter HER-2/neu Kopienzahl und Kopienzahl pro Chromosom 17

Da die Chromosom 17 Anzahl pro Zellkern ebenfalls variierte (1: 1 %; 2: 64 %; 3: 26 %; 4: 5 %; 5: 4 %), wurde außer der absoluten HER-2/neu Kopienzahl pro Zellkern auch noch die Anzahl der HER-2/neu Kopien pro Chromosom 17 bestimmt (Tabelle 6). Aufgrund des sehr starken Zusammenhangs zwischen diesen beiden Größen wurde im folgenden nur der Einfluß des Absolutwertes auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht.

	Ausprägung	Anzahl d. HER-2/neu Kopien pro Chromosom 17		Summe
		≤ 4	> 4	
absolute HER-2/neu Kopienzahl	< 8	146 (95 %)	0 (0 %)	146
	≥ 8	7 (5 %)	52 (100 %)	59
	Summe	153	52	205

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen absoluter HER-2/neu Kopienzahl pro Zellkern und Anzahl der HER-2/neu Kopien pro Chromosom 17

3.4 Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate ohne Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Expression	negativ/schwach stark	1.00 2.71	--- [1.84 , 3.98]	0.0001

Tabelle 7a: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Überexpression** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	3-7 vs 1-2 8-22 vs 3-7 ≥ 23 vs 8-22	0.96 2.30 1.11	[0.61 , 1.50] [1.32 , 4.00] [0.61 , 2.01]	0.0001

Tabelle 7b: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen

Verfahren : Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8 ≥ 8	1.00 2.37	--- [1.63 , 3.45]	0.0001

Tabelle 7c: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei Annahme einer Schwelle von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern für die Amplifikation

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Expression	negativ/schwach stark	1.00 2.00	--- [1.10 , 3.64]	0.023
HER-2/neu Kopienzahl	< 8 ≥ 8	1.00 1.47	--- [0.82 , 2.62]	0.19

Tabelle 7d: Bivariate Analyse des Effekts von HER-2/neu **Überexpression und Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

Tabelle 7a-d: Analyse des Effekts von HER-2/neu Überexpression und Amplifikation auf die *rezidivfreie Überlebensrate* ohne Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren
(205 Patientinnen / 121 Rezidive/Todesfälle)

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Expression	negativ/schwach stark	1.00 2.63	--- [1.76 , 3.94]	0.0001

Tabelle 8a: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Überexpression** auf die *Gesamtüberlebensrate*

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	3-7 vs 1-2	1.04	[0.64 , 1.67]	0.0003
	8-22 vs 3-7	2.10	[1.18 , 3.75]	
	≥ 23 vs 8-22	1.21	[0.65 , 2.27]	

Tabelle 8b: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen

Verfahren : Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8 ≥ 8	1.00 2.37	--- [1.60 , 3.52]	0.0001

Tabelle 8c: Univariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei Annahme einer Schwelle von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern für die Amplifikation

Verfahren: Bestimmung der	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %- Konfidenz- intervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Expression	negativ/schwach stark	1.00 1.92	--- [1.03 , 3.58]	0.039
HER-2/neu Kopienzahl	< 8 ≥ 8	1.00 1.50	--- [0.82 , 2.76]	0.19

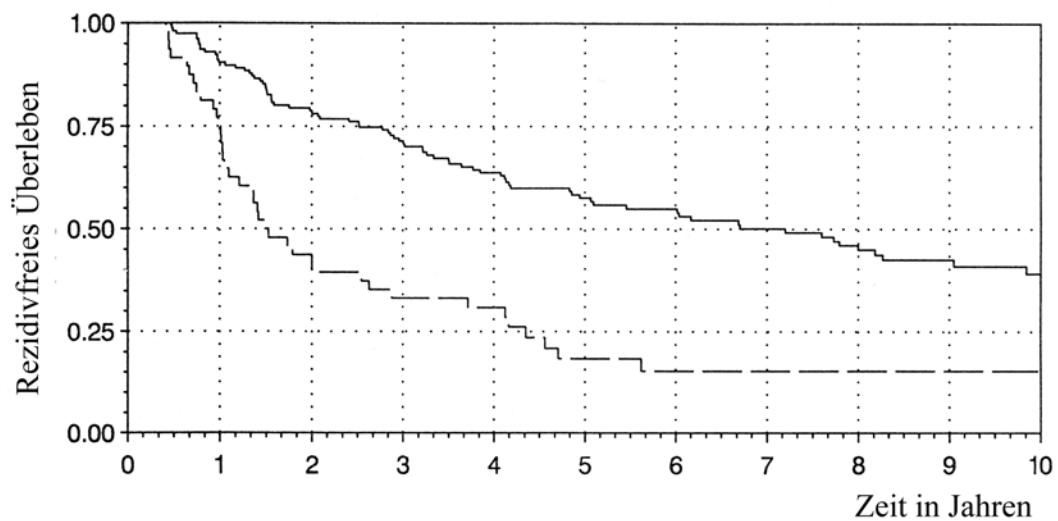
Tabelle 8d: Bivariate Analyse des Effekts von HER-2/neu **Überexpression und Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate*

Tabelle 8a-d: Analyse des Effekts von HER-2/neu Überexpression und Amplifikation auf die *Gesamtüberlebensrate* ohne Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren (205 Patientinnen / 107 Rezidive/Todesfälle)

Beim Stand der Nachbeobachtungen vom Dezember 1997 war es im HER-2/neu Kollektiv bei 121 der 205 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen zu einem Rezidiv gekommen (59 %) und 107 Patientinnen waren verstorben (52 %).

In dem Kollektiv, in dem HER-2/neu nicht bestimmt worden war, lag die Rezidivrate bei 55 % (465 Rezidive bei 843 Patientinnen) und es waren 407 Patientinnen verstorben (48 %).

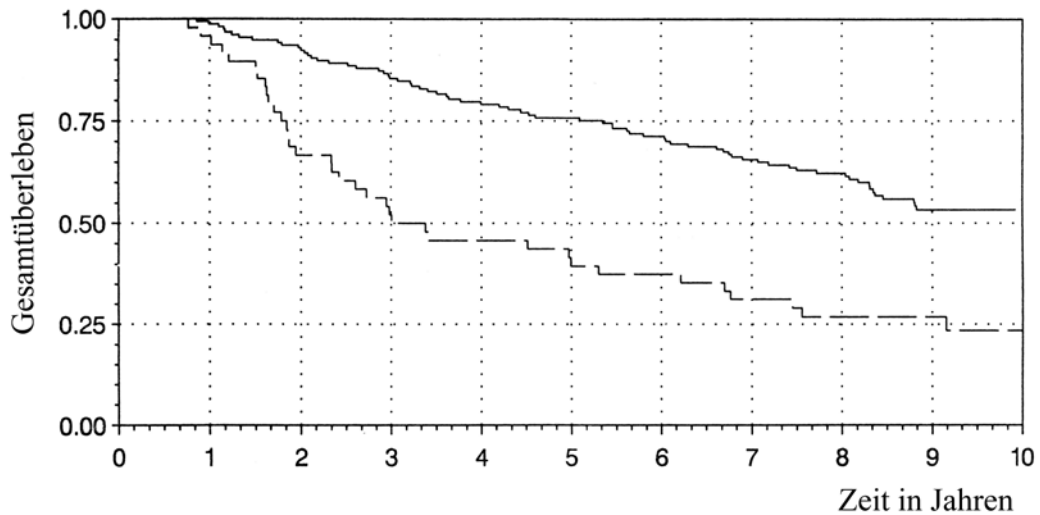
Die Analyse des Effekts der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit zeigt einen sehr starken Effekt der Expression (siehe Abbildung 3 und 4).



Expression	Anzahl der Patientinnen										
negativ/ schwach	157	140	119	104	87	70	58	50	44	30	19
stark	48	36	21	16	13	6	5	4	4	3	1

HER-2/neu Expression
 negativ/schwach
 stark

Abbildung 3: Effekt der HER-2/neu **Überexpression** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

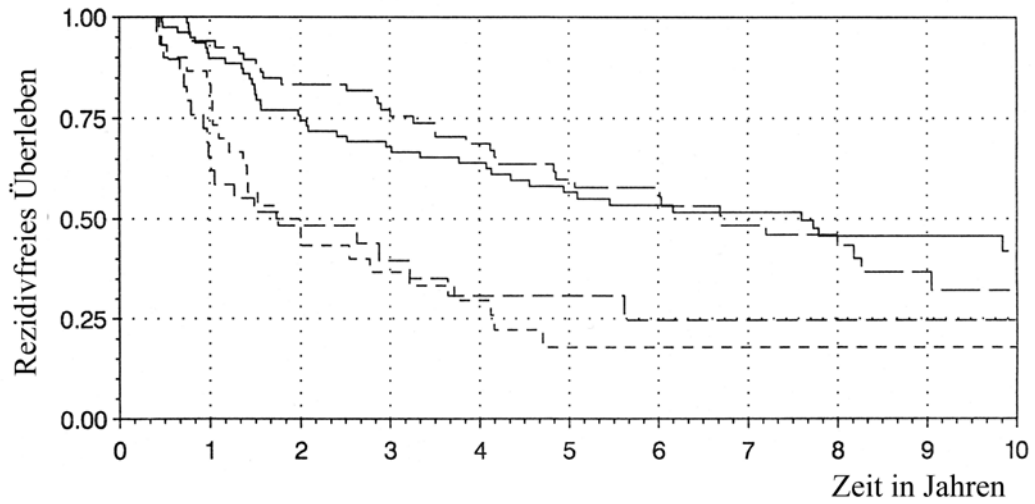


Expression	Anzahl der Patientinnen										
negativ / schwach	157	155	146	134	124	119	112	100	86	54	38
stark	48	46	32	25	22	19	18	14	11	8	3

HER-2/neu Expression
 negativ/schwach
 stark

Abbildung 4: Effekt der HER-2/neu **Überexpression** auf die *Gesamtüberlebensrate*

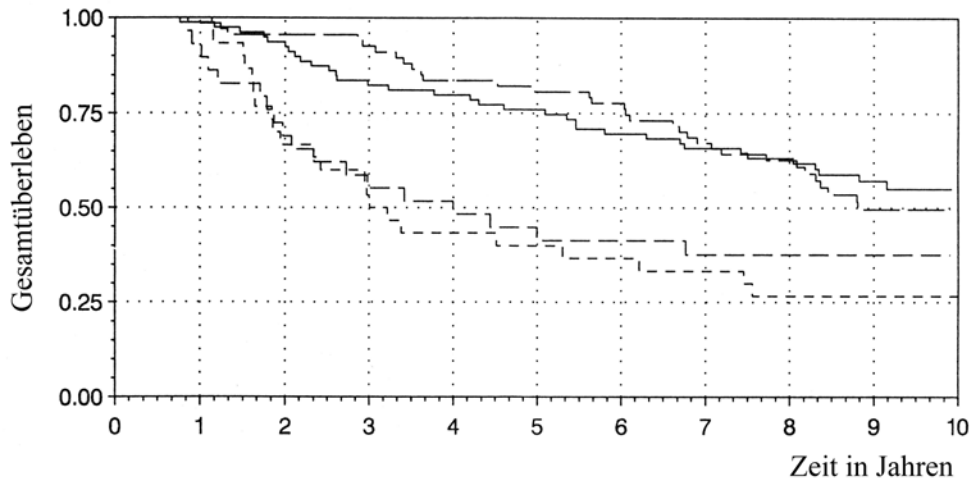
Die Amplifikation zeigt ebenfalls einen starken Einfluß, wobei man jedoch bei Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen eine deutliche Trennung der rezidivfreien und Gesamtüberlebensraten bei einem Schwellenwert von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern findet. Die Patientinnen mit 3-7 HER-2/neu Kopien pro Zellkern haben im Vergleich zu Patientinnen mit einer normalen Kopienzahl von 1-2 keine schlechtere Prognose und auch eine sehr hohe Kopienzahl von ≥ 23 verschlechtert die Prognose im Vergleich zu 8-22 Kopien nicht (siehe Abbildung 5 und 6).



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
1-2	79	70	58	52	46	37	30	27	23	19	11
3-7	67	62	54	48	40	30	25	20	18	8	6
8-22	29	19	13	9	6	5	4	3	3	3	2
≥ 23	30	25	15	11	8	4	4	4	4	3	1

HER-2/neu Kopienzahl
 1-2
 3-7
 8-22
 ≥ 23

Abbildung 5: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen

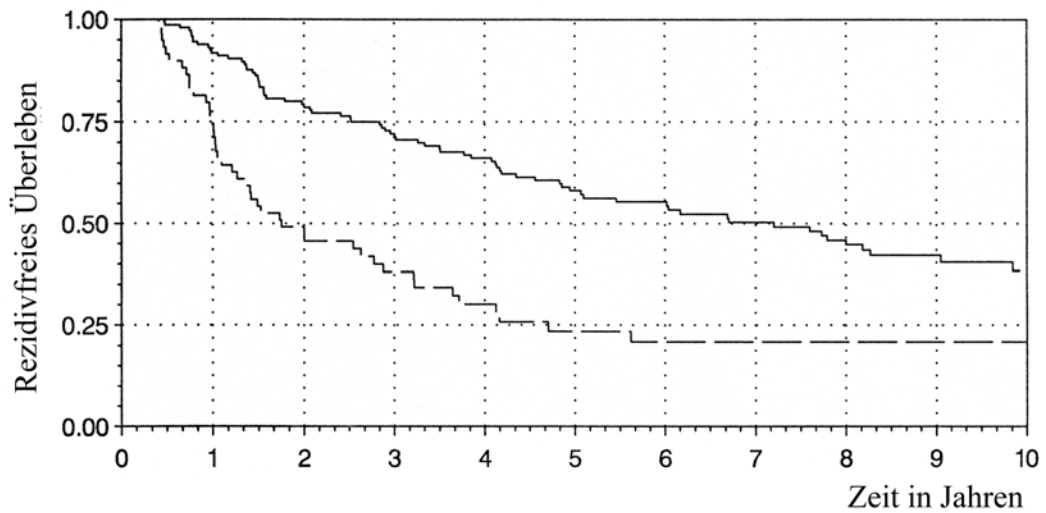


HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
1-2	79	78	74	65	63	60	55	51	45	31	20
3-7	67	66	64	62	56	54	52	45	39	21	14
8-22	29	27	20	16	14	12	12	8	5	5	5
≥ 23	30	30	20	16	13	12	11	10	8	5	2

HER-2/neu Kopienzahl
 1-2
 3-7
 8-22
 ≥ 23

Abbildung 6: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen

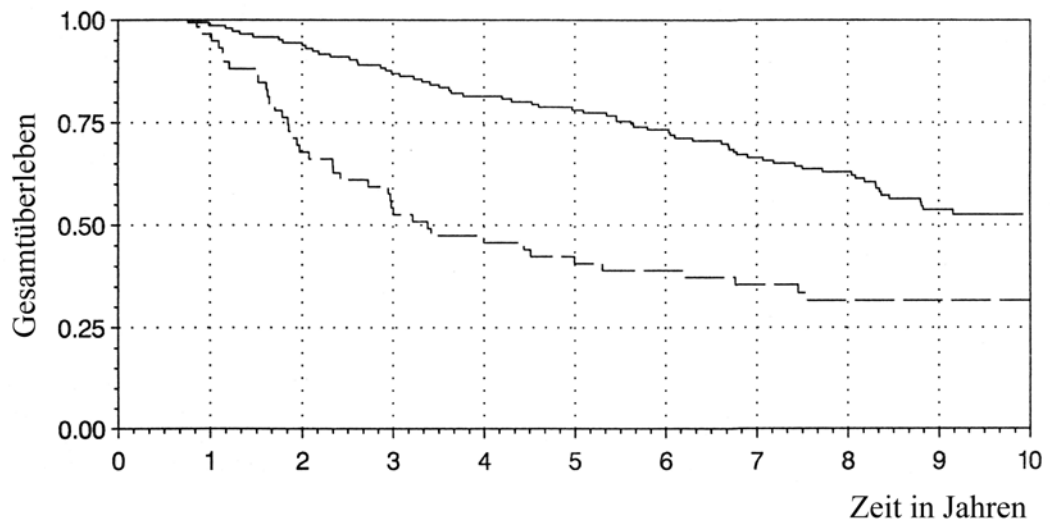
Da die Unterteilung des Amplifikationsgrades in 3 Gruppen (3-7; 8-22; ≥ 23) offensichtlich keinen Vorteil bringt, wurden die Analysen der Amplifikation im folgenden nur noch in der Aufteilung < 8 versus ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern durchgeführt (Abbildung 7 und 8).



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	146	132	112	100	86	67	55	47	41	27	17
≥ 8	59	44	28	20	14	9	8	7	7	6	3

HER-2/neu Kopienzahl — < 8 — ≥ 8

Abbildung 7: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei Annahme einer Schwelle von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern für die Amplifikation

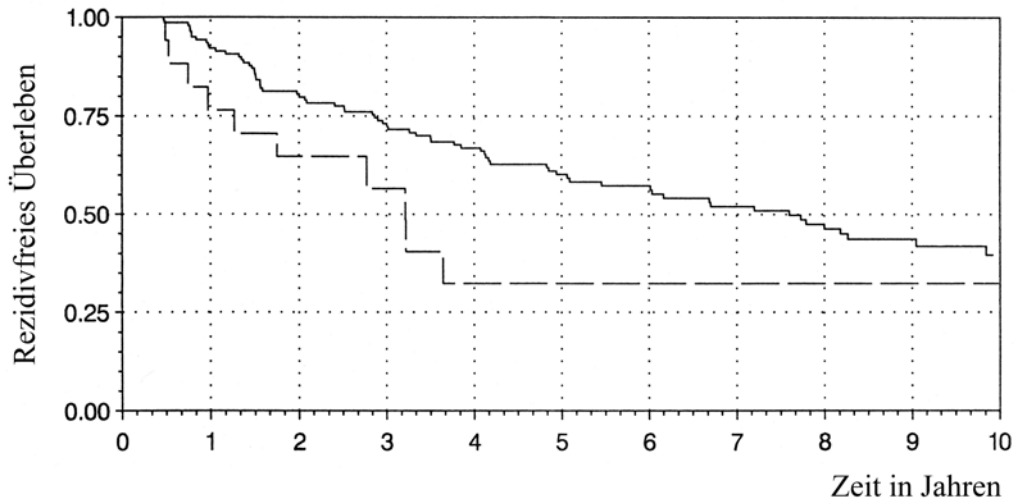


HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	146	144	138	127	119	114	107	96	84	52	34
≥ 8	59	57	40	32	27	24	23	18	13	10	7

HER-2/neu Kopienzahl
 < 8
 ≥ 8

Abbildung 8: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei Annahme einer Schwelle von ≥ 8 HER-2/neu Kopien für die Amplifikation

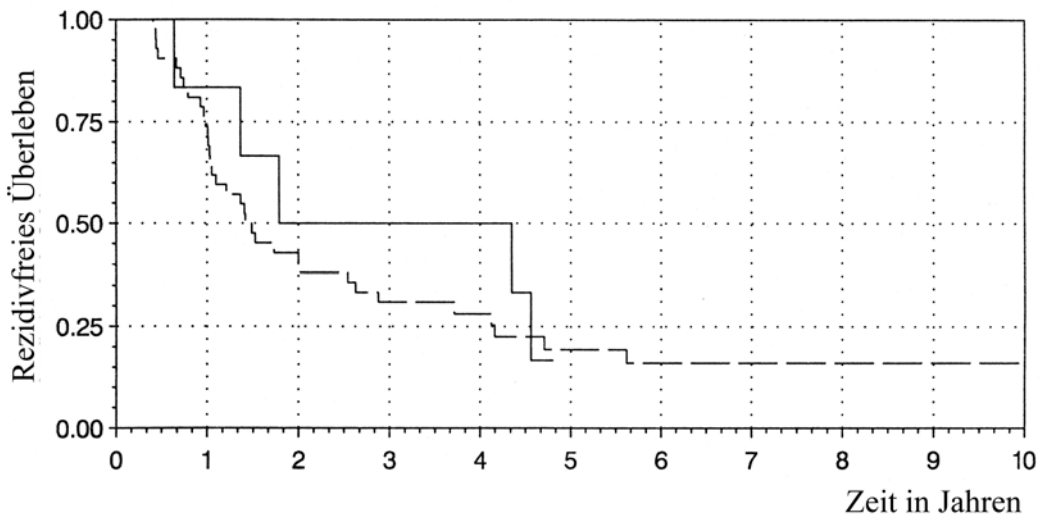
Bei gemeinsamer Analyse von HER-2/neu Kopienzahl und Proteinexpression dominiert der Effekt der Expression. Ein zur Überexpression zusätzlicher Effekt der Amplifikation ist - ohne Berücksichtigung der anderen prognostischen Faktoren - tendenziell vorhanden, allerdings momentan noch nicht zu beweisen (Abbildung 9 - 12). Bei Mammakarzinomen mit einer negativen/schwachen immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Expression bedeutet es offensichtlich eine Verschlechterung der Prognose, wenn eine mit Hilfe von FISH bestimmte Amplifikation des HER-2/neu Onkogens vorliegt.



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	140	127	109	97	83	67	55	47	41	27	17
≥ 8	17	13	10	7	4	3	3	3	3	3	2

HER-2/neu Kopienzahl ——— < 8 ——— ——— ≥ 8

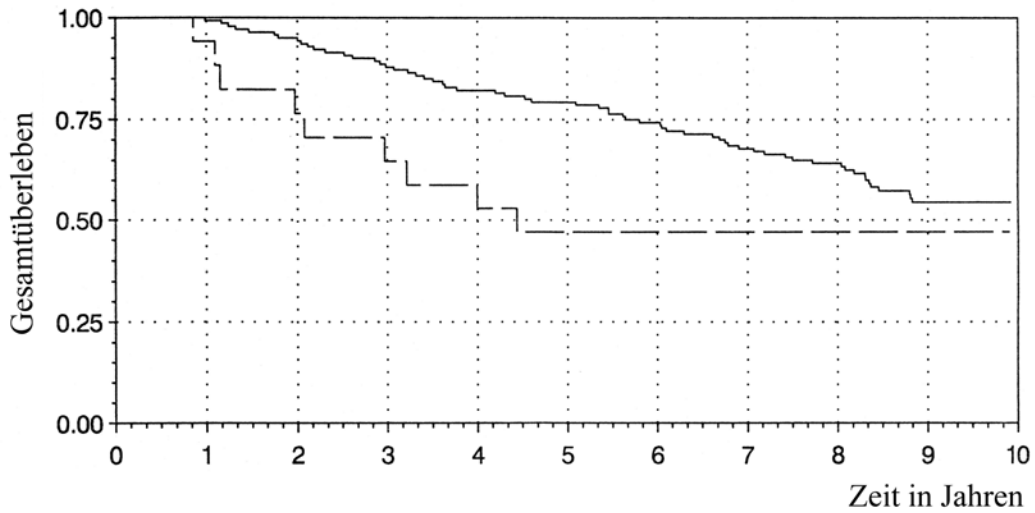
Abbildung 9: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei keiner/schwacher Expression



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	6	5	3	3	3	0	0	0	0	0	0
≥ 8	42	31	18	13	10	6	5	4	4	3	1

HER-2/neu Kopienzahl ——— < 8 ——— ——— ≥ 8

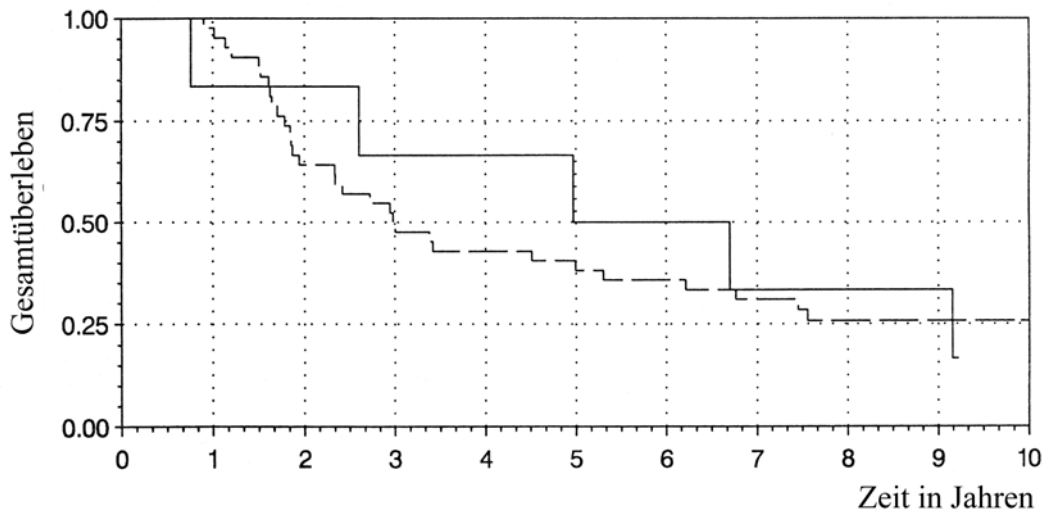
Abbildung 10: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei starker Expression



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	140	139	133	123	115	111	104	94	82	50	34
≥ 8	17	16	13	11	9	8	8	6	4	4	4

HER-2/neu Kopienzahl ——— < 8 - - - - ≥ 8

Abbildung 11: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei keiner/schwacher Expression



HER-2/neu Kopienzahl	Anzahl der Patientinnen										
< 8	6	5	5	4	4	3	3	2	2	2	0
≥ 8	42	41	27	21	18	16	15	12	9	6	3

HER-2/neu Kopienzahl ——— < 8 - - - - ≥ 8

Abbildung 12: Effekt der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate* bei starker Expression

3.5 Zusammenhang zwischen HER-2/neu Amplifikation und Überexpression und anderen prognostischen Faktoren

Faktor	Ausprägung	Expression negativ/schwach N=157	Expression stark N=48	p-Wert (*)
Alter	≤ 40	12 (8 %)	6 (13 %)	0.44
	41-60	88 (56 %)	26 (54 %)	
	> 60	57 (36 %)	16 (33 %)	
Menopause	prämenopausal	58 (63 %)	17 (35 %)	0.85
	postmenopausal	99 (63 %)	31 (65 %)	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	92 (59 %)	20 (43 %)	0.024
	4-9	45 (29 %)	16 (34 %)	
	> 9	19 (12 %)	11 (23 %)	
Tumorgroße	≤ 20 mm	45 (29 %)	14 (29 %)	0.39
	21-30 mm	74 (47 %)	17 (35 %)	
	> 30 mm	38 (24 %)	17 (35 %)	
Tumorgrad Bloom & Richardson	I	18 (12 %)	1 (2 %)	0.045
	II	107 (68 %)	33 (69 %)	
	III	32 (20 %)	14 (29 %)	
Östrogenrezeptor	≥ 20 fmol/mg	110 (71 %)	12 (26 %)	0.001
	< 20 fmol/mg	45 (29 %)	34 (74 %)	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	97 (64 %)	11 (24 %)	0.001
	< 20 fmol/mg	55 (36 %)	35 (76 %)	
Histologischer Tumortyp	solide/Kombi/and	103 (66 %)	37 (77 %)	0.29
	lobulär	16 (10 %)	1 (2 %)	
	Milchgang	22 (14 %)	4 (8 %)	
	tubulär/mucinös	7 (4 %)	2 (4 %)	
	medullär	9 (6 %)	4 (8 %)	

(*) p-Wert des Mantel-Haenszel Tests (1 FG) auf Trend, bei Tumortyp p-Wert des χ^2 -Tests auf generelle Assoziation (4 FG)

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen HER-2/neu **Überexpression** und anderen prognostischen Faktoren

Faktor	Ausprägung	HER-2/neu Kopienzahl < 8 N=146	Amplifikation ≥ 8 Kopien N=59	p-Wert (*)
Alter	≤ 40	13 (9 %)	5 (8 %)	0.64
	41-60	79 (54 %)	35 (59 %)	
	> 60	54 (37 %)	19 (32 %)	
Menopause	prämenopausal	54 (37 %)	21 (36 %)	0.85
	postmenopausal	92 (63 %)	38 (64 %)	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	85 (58 %)	27 (47 %)	0.046
	4-9	43 (30 %)	18 (31 %)	
	> 9	17 (12 %)	13 (22 %)	
Tumorgröße	≤ 20 mm	46 (31 %)	13 (22 %)	0.092
	21-30 mm	65 (45 %)	26 (44 %)	
	> 30 mm	35 (24 %)	20 (34 %)	
Tumorgrad Bloom & Richardson	I	18 (12 %)	1 (2 %)	0.042
	II	98 (67 %)	42 (71 %)	
	III	30 (21 %)	16 (27 %)	
Östrogen- rezeptor	≥ 20 fmol/mg	103 (72 %)	19 (33 %)	0.001
	< 20 fmol/mg	41 (28 %)	38 (67 %)	
Progesteron- rezeptor	≥ 20 fmol/mg	89 (63 %)	19 (34 %)	0.001
	< 20 fmol/mg	53 (37 %)	37 (66 %)	
Histologischer Tumortyp	solide/Kombi/and	98 (67 %)	42 (71 %)	0.53
	lobulär	15 (10 %)	2 (3 %)	
	Milchgang	17 (12 %)	9 (15 %)	
	tubulär/mucinös	7 (5 %)	2 (3 %)	
	medullär	9 (6 %)	4 (7 %)	

(*) p-Wert des Mantel-Haenszel Tests (1 FG) auf Trend, bei Tumortyp p-Wert des χ^2 -Tests auf generelle Assoziation (4 FG)

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen HER-2/neu **Amplifikation** und anderen prognostischen Faktoren

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der HER-2/neu Amplifikation bzw. Überexpression und anderen etablierten Prognosefaktoren ergab folgende Ergebnisse: Es besteht ein schwach signifikanter Zusammenhang zur Anzahl befallener Lymphknoten und zum Tumorgrad. Außerdem findet man eine starke inverse Korrelation zum Steroidhormonrezeptorstatus: Tumore mit Amplifikation bzw. Überexpression sind überwiegend östrogen- und progesteronrezeptornegativ, wohingegen Tumore ohne Amplifikation bzw. mit negativer oder schwacher Expression überwiegend hormonrezeptorpositiv sind.

3.6 Univariate und multivariate Analyse der Effekte der anderen prognostischen Faktoren auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate

Eine adäquate Bewertung des Effekts der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression muß die Standardfaktoren berücksichtigen, d.h. die Analyse muß für diese Faktoren adjustiert sein. Um zu entscheiden, welche der etablierten Prognosefaktoren zur Adjustierung einzubeziehen sind, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden die univariaten Effekte der etablierten prognostischen Faktoren auf die rezidivfreie und die Gesamtüberlebensrate im HER-2/neu Kollektiv untersucht (Tabelle 11 und 12).

Faktor	Ausprägung	Anzahl der Pat.	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Alter	≤ 40	205	1.00	---	0.17
	41-60		0.59	[0.32 , 1.09]	
	> 60		0.75	[0.40 , 1.42]	
Menopause	prämenopausal	205	1.00	---	0.38
	postmenopausal		1.19	[0.81 , 1.74]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	203	1.00	---	0.0001
	4-9		1.70	[1.13 , 2.56]	
	> 9		3.56	[2.20 , 5.77]	
Tumorgröße	≤ 20 mm	205	1.00	---	0.0005
	21-30 mm		1.02	[0.65 , 1.60]	
	> 30 mm		2.14	[1.35 , 3.40]	
Tumorgrad	I	205	1.00	---	0.071
	II		2.04	[0.94 , 4.42]	
	III		2.59	[1.14 , 5.88]	
Östrogenrezeptor	≥ 20 fmol/mg	201	1.00	---	0.035
	< 20 fmol/mg		1.48	[1.03 , 2.14]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	198	1.00	---	0.0009
	< 20 fmol/mg		1.87	[1.29 , 2.70]	
Histologischer Tumortyp	solide/Kombi/and lobulär	205	1.00	---	0.85
	Milchgang		0.77	[0.37 , 1.59]	
	tubulär/mucinös		1.04	[0.62 , 1.75]	
	medullär		0.93	[0.38 , 2.28]	
			0.69	[0.32 , 1.50]	

Tabelle 11: Univariate Analyse der Effekte der **anderen prognostischen Faktoren** auf die *rezidivfreie Überlebensrate* (205 Patientinnen / 121 Rezidive/Todesfälle)

Faktor	Ausprägung	Anzahl der Pat.	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Alter	≤ 40	205	1.00	---	0.073
	41-60		0.53	[0.28 , 1.00]	
	> 60		0.75	[0.40 , 1.43]	
Menopause	prämenopausal	205	1.00	---	0.29
	postmenopausal		1.25	[0.83 , 1.86]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	203	1.00	---	0.0001
	4-9		1.67	[1.08 , 2.59]	
	> 9		4.30	[2.62 , 7.06]	
Tumorgröße	≤ 20 mm	205	1.00	---	0.0001
	21-30 mm		0.98	[0.60 , 1.60]	
	> 30 mm		2.32	[1.42 , 3.79]	
Tumorgrad	I	205	1.00	---	0.009
	II		3.41	[1.24 , 9.32]	
	III		4.90	[1.72 , 14.0]	
Östrogenrezeptor	≥ 20 fmol/mg	201	1.00	---	0.0013
	< 20 fmol/mg		1.89	[1.28 , 2.78]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	198	1.00	---	0.0001
	< 20 fmol/mg		2.53	[1.70 , 3.77]	
Histologischer Tumortyp	solide/Kombi/and	205	1.00	---	0.44
	lobulär		0.84	[0.41 , 1.74]	
	Milchgang		0.87	[0.48 , 1.56]	
	tubulär/mucinös		0.15	[0.02 , 1.10]	
	medullär		0.93	[0.43 , 2.01]	

Tabelle 12: Univariate Analyse der Effekte der **anderen prognostischen Faktoren** auf die *Gesamtüberlebensrate* (205 Patientinnen / 107 Rezidive/Todesfälle)

Die Anzahl befallener Lymphknoten, die Tumorgröße und die Steroidhormonrezeptoren sind univariat die stärksten prognostischen Faktoren, etwas geringere Effekte zeigen darüber hinaus noch der Tumorgrad und das Alter der Patientin.

Um zu entscheiden bezüglich welcher dieser Faktoren nun die Analyse der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression zu adjustieren ist, wurde eine multivariate Analyse der prognostischen Faktoren durchgeführt, die univariat einen zum 10 %-Niveau signifikanten Einfluß auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate zeigen.

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Alter	≤ 40	1.00	---	0.047
	41-60	0.56	[0.28 , 1.09]	
	> 60	0.88	[0.44 , 1.77]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.0014
	4-9	1.41	[0.91 , 2.20]	
	> 9	2.78	[1.60 , 4.84]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.014
	21-30 mm	1.01	[0.62 , 1.64]	
	> 30 mm	1.93	[1.13 , 3.27]	
Tumorgrad	I	1.00	---	0.40
	II	1.73	[0.74 , 4.07]	
	III	1.89	[0.75 , 4.75]	
Östrogenrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.77
	< 20 fmol/mg	0.93	[0.60 , 1.46]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.018
	< 20 fmol/mg	1.70	[1.09 , 2.65]	

Tabelle 13: Multivariate Analyse der Effekte der anderen prognostischen Faktoren auf die *rezidivfreie Überlebensrate*, die univariat auf die rezidivfreie oder absolute Überlebensrate einen Einfluß zum 10 %-Niveau zeigen (194 Patientinnen / 111 Rezidive/Todesfälle)

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Alter	≤ 40	1.00	---	0.024
	41-60	0.67	[0.34 , 1.30]	
	> 60	1.22	[0.60 , 2.49]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.0001
	4-9	1.19	[0.73 , 1.94]	
	> 9	3.20	[1.83 , 5.62]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.006
	21-30 mm	0.99	[0.58 , 1.67]	
	> 30 mm	2.09	[1.20 , 3.64]	
Tumorgrad	I	1.00	---	0.16
	II	2.60	[0.93 , 7.28]	
	III	2.88	[0.96 , 8.67]	
Östrogenrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.89
	< 20 fmol/mg	1.04	[0.64 , 1.68]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.0007
	< 20 fmol/mg	2.31	[1.43 , 3.73]	

Tabelle 14: Multivariate Analyse der Effekte der **anderen prognostischen Faktoren** auf die *Gesamtüberlebensrate*, die univariat auf die rezidivfreie oder absolute Überlebensrate einen Einfluß zum 10 %-Niveau zeigen (194 Patientinnen / 99 Todesfälle)

In dieser multivariaten Analyse zeigen die Faktoren Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgröße und Progesteronrezeptorstatus einen Effekt zum 10 %-Niveau.

3.7 Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die rezidivfreie Überlebensrate und die Gesamtüberlebensrate bei Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren

Die Bewertung des unabhängigen prognostischen Effektes der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression wurde in einem Modell durchgeführt, das zur Adjustierung die Faktoren enthält, die in den multivariaten Analysen einen Effekt zum 10 %-Niveau gezeigt haben: Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgröße und Progesteronrezeptorstatus. Darüber hinaus wurden die Analysen der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression bezüglich der verabreichten Therapie stratifiziert: 3x CMF, 6 x CMF, 3 x CMF + TAM, 6 x CMF + TAM, 6 x CMF + RAD (CMF = Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil; TAM = Tamoxifen; RAD = Radiatio), d.h. der Therapieeffekt wurde nicht geschätzt, Unterschiede der Therapiegruppen wurden jedoch zugelassen und zur Adjustierung des HER-2/neu Effekts berücksichtigt. Die Analysen basieren auf 196 Patientinnen, für die alle einbezogenen prognostischen Faktoren vollständig erhoben sind.

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Expression	negativ/schwach	1.00	---	0.0016
	stark	2.06	[1.32 , 3.23]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.12
	41-60	0.57	[0.28 , 1.13]	
	> 60	0.79	[0.39 , 1.63]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.011
	3-9	1.37	[0.88 , 2.15]	
	> 9	2.47	[1.37 , 4.44]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.013
	21-30 mm	0.98	[0.60 , 1.61]	
	> 30 mm	1.91	[1.12 , 3.25]	
Progesteron-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.076
	< 20 fmol/mg	1.44	[0.96 , 2.14]	

Tabelle 15a: Multivariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Überexpression** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8	1.00	---	0.0031
	≥ 8	1.91	[1.24 , 2.93]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.089
	41-60	0.53	[0.27 , 1.06]	
	> 60	0.75	[0.37 , 1.54]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.0047
	3-9	1.45	[0.92 , 2.27]	
	> 9	2.64	[1.47 , 4.73]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.026
	21-30 mm	0.91	[0.55 , 1.50]	
	> 30 mm	1.74	[1.01 , 2.98]	
Progesteron-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.037
	< 20 fmol/mg	1.52	[1.03 , 2.24]	

Tabelle 15b: Multivariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8	1.00	---	0.38
	≥ 8	1.35	[0.69 , 2.63]	
Expression	negativ/schwach	1.00	---	0.17
	stark	1.63	[0.81 , 3.27]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.12
	41-60	0.55	[0.28 , 1.11]	
	> 60	0.77	[0.37 , 1.59]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.012
	3-9	1.40	[0.89 , 2.20]	
	> 9	2.46	[1.36 , 4.45]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.020
	21-30 mm	0.95	[0.58 , 1.57]	
	> 30 mm	1.82	[1.06 , 3.14]	
Progesteron-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.070
	< 20 fmol/mg	1.45	[0.97 , 2.16]	

Tabelle 15c: Multivariate Analyse des Effekts von HER-2/neu **Amplifikation und Überexpression** auf die *rezidivfreie Überlebensrate*

Tabelle 15a-c: Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die *rezidivfreie Überlebensrate* bei Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren (196 Patientinnen / 113 Rezidive/Todesfälle)

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
Expression	negativ/schwach	1.00	---	0.026
	stark	1.70	[1.07 , 2.72]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.21
	41-60	0.74	[0.36 , 1.51]	
	> 60	1.09	[0.52 , 2.28]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.001
	3-9	1.07	[0.65 , 1.77]	
	> 9	2.82	[1.56 , 5.11]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.012
	21-30 mm	1.05	[0.62 , 1.80]	
	> 30 mm	2.07	[1.18 , 3.62]	
Progesteron-rezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.0012
	< 20 fmol/mg	2.04	[1.33 , 3.14]	

Tabelle 16a: Multivariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Überexpression** auf die *Gesamtüberlebensrate*

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8	1.00	---	0.027
	≥ 8	1.65	[1.06 , 2.58]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.17
	41-60	0.70	[0.35 , 1.41]	
	> 60	1.04	[0.50 , 2.17]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.0006
	3-9	1.11	[0.67 , 1.84]	
	> 9	2.95	[1.64 , 5.31]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.017
	21-30 mm	1.03	[0.60 , 1.76]	
	> 30 mm	1.99	[1.13 , 3.49]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.0006
	< 20 fmol/mg	2.10	[1.38 , 3.20]	

Tabelle 16b: Multivariate Analyse des Effekts der HER-2/neu **Amplifikation** auf die *Gesamtüberlebensrate*

Faktor	Ausprägung	geschätztes relatives Risiko	95 %-Konfidenzintervall	p-Wert (Wald-Test)
HER-2/neu Kopienzahl	< 8	1.00	---	0.44
	≥ 8	1.32	[0.65 , 2.70]	
Expression	negativ/schwach	1.00	---	0.43
	stark	1.36	[0.64 , 2.86]	
Alter	≤ 40	1.00	---	0.21
	41-60	0.73	[0.36 , 1.49]	
	> 60	1.07	[0.51 , 2.24]	
Anzahl befallener Lymphknoten	1-3	1.00	---	0.001
	3-9	1.09	[0.66 , 1.80]	
	> 9	2.83	[1.56 , 5.14]	
Tumorgroße	≤ 20 mm	1.00	---	0.016
	21-30 mm	1.05	[0.61 , 1.79]	
	> 30 mm	2.02	[1.15 , 3.54]	
Progesteronrezeptor	≥ 20 fmol/mg	1.00	---	0.0011
	< 20 fmol/mg	2.05	[1.33 , 3.14]	

Tabelle 16c: Multivariate Analyse des Effekts von HER-2/neu **Amplifikation und Überexpression** auf die *Gesamtüberlebensrate*

Tabelle 16a-c: Analyse des Effekts von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression auf die *Gesamtüberlebensrate* bei Berücksichtigung anderer prognostischer Faktoren (196 Patientinnen / 101 Todesfälle)

Diese Analysen bestätigen, daß das HER-2/neu Onkogen einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt. Dies läßt sich sowohl für die Amplifikation als auch die Überexpression nachweisen, was bei der hohen Korrelation der beiden Faktoren zu erwarten war. Außerdem ist bei simultaner Analyse der Faktoren in einem Modell ein statistisch nicht signifikanter Trend zu sehen, der darauf hinweist, daß die Amplifikation vermutlich zusätzliche prognostische Information zur Überexpression liefert. Bei einer negativen/schwachen immunhistochemischen Färbintensität, d.h. bei Mammakarzinomen ohne HER-2/neu Überexpression, bedeutet es offensichtlich eine Verschlechterung der Prognose, wenn die HER-2/neu Genkopienzahl erhöht ist, also eine Amplifikation des Onkogens vorliegt.

4. Diskussion

Beim Mammakarzinom wird die Bestimmung von Prognosefaktoren mittlerweile routinemäßig durchgeführt. Dadurch soll es ermöglicht werden, Vorhersagen über das Risiko von Lokalrezidiven und Fernmetastasierungen bzw. über die Überlebenszeit zu machen und somit Risikopatientinnen mit einer schlechteren Prognose zu identifizieren. Dies ist von besonderer Bedeutung für eine risikoadaptierte adjuvante Therapieplanung.

Bis heute gilt der axilläre Lymphknotenstatus als der stärkste Prädiktor für Rezidiv und Überleben.^{5,7,17,22} Weitere etablierte Prognosefaktoren sind Tumorgöße, Tumorgrad, histologischer Tumortyp, evtl. vorhandene Fernmetastasierung, Steroidhormonrezeptorstatus und Menopausenalter. Darüber hinaus sind in den letzten Jahren eine Vielzahl neuerer Prognosefaktoren in die Diskussion aufgenommen worden, die morphologische, zellkinetische und tumorbiologische Aspekte berücksichtigen. Ob es mit ihrer Hilfe tatsächlich gelingt, die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms weiter zu optimieren bzw. zu individualisieren, muß zum Teil erst noch bewiesen werden.

Damit ein solcher Faktor tatsächlich klinische Relevanz erlangen kann, müssen bestimmte Anforderungen erfüllt werden. Eine relativ einfache und überall nachvollziehbare Nachweismethode des Faktors ist dabei Voraussetzung für die weitere Verbreitung, welche durch komplizierte apparative und technische Verfahren verhindert würde. Außerdem müssen univariate Analysen in bezug auf Rezidiv und Tod, eine Korrelation des neuen Prognosefaktors mit bereits etablierten Faktoren und vor allem auch multivariate Analysen durchgeführt werden. Mit Hilfe der Multivarianzanalyse (Cox-Regression) läßt sich der unabhängige Charakter und die Stärke des Prognosefaktors im Vergleich zu anderen Faktoren ermitteln („Relatives Risiko“). Schließlich sollten vor der Umsetzung in den klinischen Alltag noch randomisierte, prospektive Studien zur Abschätzung des Therapieeffektes stehen.⁵

In diesem Zusammenhang sind in den letzten Jahren etliche Untersuchungen zur Klärung der klinischen Bedeutung der Amplifikation und Überexpression des HER-2/neu Onkogens durchgeführt worden. Es handelt sich hierbei offensichtlich um einen interessanten Marker sowohl für die Prognose von Mammakarzinompatientinnen als auch vermutlich für das Ansprechen auf adjuvante und neoadjuvante Therapieformen (Chemotherapie und Hormontherapie).^{6,12-16,21,24-32} Außerdem hat das HER-2/neu Rezeptorprotein mittlerweile zusätzliche Bedeutung als Angriffspunkt für neuere Formen der Therapie des fortgeschrittenen HER-2/neu überexprimierten Mammakarzinoms gewonnen. Der monoklonale Anti-HER-2-Antikörper Herceptin[®] ist seit September 2000 für diesen Einsatz zugelassen.⁶⁸⁻⁷⁰

Für die Tatsache, daß die klinische Relevanz nach wie vor kontrovers diskutiert wird, machen einige Autoren vor allem die unterschiedlichen Studiendesigns verantwortlich.^{33,34} Viele der Untersuchungen wurden an zu kleinen Patientinnenkollektiven durchgeführt, die die Entdeckung statistisch signifikanter Korrelationen auch aufgrund einer zu geringen Anzahl an Ereignissen (Rezidiv oder Tod) verhindern. Dies limitiert die Aussagekraft ebenso wie zu kurze Nachbeobachtungszeiten. Da beim Mammakarzinom auch nach 5-10 Jahren noch das Risiko eines Rezidivs besteht, erlauben Nachbeobachtungszeiten unter 3 Jahren keine validen Aussagen zur möglichen Prognoseverbesserung durch adjuvante Therapieformen. Weitere Probleme sind nicht reproduzierbare Nachweismethoden, der retrospektive Charakter vieler Studien und inadäquate statistische Methoden. Um die hypothetischen Aussagen der kleineren Studien zu überprüfen und eventuell zu bestätigen, müssen also Untersuchungen mit klarem Studiendesign an genügend großen, eindeutig definierten Kollektiven durchgeführt werden. Auch bei der *Consensus Conference on Primary Treatment of Breast Cancer* wurde gefordert, die bisher gewonnen Ergebnisse bezüglich des prognostischen und prädiktiven Wertes des HER-2/neu Onkogens in großen, randomisierten und prospektiven Studien zu bestätigen.²¹

In dieser Arbeit wurde auf Tumormaterial aus den prospektiven multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)*

zurückgegriffen. Es handelt sich hierbei um randomisierte Studien mit klaren Ein- und Ausschlußkriterien, bei denen auch die Durchführung der adjuvanten Therapie eindeutig festgelegt war (siehe „Material und Methoden“). Die Studien umfaßten insgesamt 1710 Mammakarzinompatientinnen, von denen 1048 Patientinnen eine Beteiligung der axillären Lymphknoten aufwiesen. In dem hier untersuchten Teilkollektiv von 205 nodalpositiven Studienpatientinnen betrug die mittlere Nachbeobachtungszeit bezüglich der rezidivfreien Überlebenszeit 8,4 Jahre und bezüglich der Gesamtüberlebenszeit 9,7 Jahre. Nachdem zuvor schon die immunhistochemische Untersuchung der HER-2/neu Überexpression an nahezu demselben Kollektiv durchgeführt worden ist, wurde nun FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) zum Nachweis der HER-2/neu Amplifikation auf das zur Verfügung stehende Tumormaterial angewandt. Durch das statistische Zentrum der Therapiestudien wurde zunächst sichergestellt, daß das untersuchte Kollektiv möglichst repräsentativ für das Gesamtkollektiv war. Danach wurden die Ergebnisse mit den klinischen Daten des Kollektivs korreliert, wobei stets ein Vergleich zwischen den durch Immunhistochemie und den durch FISH gewonnenen Ergebnissen vorgenommen wurde.

Die quantitativen Unterschiede bezüglich des Prozentsatzes an HER-2/neu amplifizierten bzw. überexprimierten Mammakarzinomen in den verschiedenen Studien (5-55 %) werden auch auf die Verwendung unterschiedlicher HER-2/neu Nachweismethoden in den einzelnen Untersuchungen zurückgeführt.^{33,81}

Einsatz finden hierbei Southern Blot oder Slot-blot Hybridisierungen, FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und Real-Time-PCR (Polymerase Chain Reaction) auf DNA-Ebene, Northern Blot und Real-Time-PCR auf RNA-Ebene und Western Blot, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) und IHC (Immunhistochemie) auf Proteinebene.^{33,49,81} Die am häufigsten angewandte Methode ist die immunhistochemische Bestimmung der HER-2/neu Proteinexpression unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Vorteile der Immunhistochemie sind der in situ-Nachweis der Überexpression und die dadurch ermöglichte differenzierte Untersuchung von z.B. intraduktaler und invasiver Karzinomkomponente, eine gute Sensitivität und Spezifität und ein geringer methodischer Aufwand. Nachteilig ist das Vorhandensein multipler

Parameter, die das immunhistochemische Färbeergebnis beeinflussen können, wie die Entnahme der Gewebeprobe, die Gewebefixierung und die Art des Fixativs, die Temperatur bei der Paraffineinbettung, die Art des Gewebeschnittes, die Hitzevorbehandlung des Gewebes, die Art und Verdünnung des Primärantikörpers, die Art des Detektionssystems, die Art des verwendeten Chromogens, die Inkubationsdauer und –temperatur und die Interpretation der Ergebnisse. All diese Faktoren erfordern ein standardisiertes Protokoll.^{33,34,81,90}

In dieser Studie wurde mit FISH einer der neueren methodischen Ansätze zur Untersuchung der Amplifikation des HER-2/neu Onkogens angewandt.

FISH ist ein Verfahren, mit dem man individuell Chromosomen, Chromosomenabschnitte und auch einzelne Gene, zum Beispiel das HER-2/neu Gen, unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar machen kann.

Bei dieser Methode werden mit einem Hapten (z.B. Biotin oder Digoxigenin) markierte DNA-Sonden verwendet, welche sich an den entsprechenden komplementären DNA-Abschnitt in einem Chromosom der Zielzelle anlagern. Dadurch entsteht nach dem Prinzip der Basenpaarung eine doppelsträngige Hybrid-DNA. Anschließend werden die Haptene durch fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert. Diese indirekte Immunfluoreszenz ist im Vergleich zur ebenfalls möglichen direkten Fluorochrommarkierung die sensitivere Technik.²³

Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, daß individuelle Chromosomen und Gene auch in Zellkernen während der Interphase sichtbar gemacht werden können. Dadurch kann die Kopienzahl spezifisch angefarbter Genomabschnitte in allen Zellen eines Gewebeschnittes ermittelt werden, was es ermöglicht FISH auf entsprechend vorbereitetem, in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumormaterial anzuwenden. Ein weiterer Vorteil dieser Technik liegt in der Tatsache, daß die Histomorphologie des Tumors erhalten bleibt und dadurch die gezielte Untersuchung der Zellen erlaubt wird. Dabei ist eine Differenzierung zwischen invasiven Karzinomanteilen, Carcinoma in situ und auch benignen Zellen in normalen Gewebeanteilen möglich. Außerdem kann man mit Hilfe von FISH auch Amplifikation in kleineren Subpopulationen und einzelnen Tumorzellen entdecken, die durch Extraktion der DNA bei Verwendung anderer

Methoden unter die Nachweisgrenze verdünnt werden könnten. FISH zeichnet sich somit durch eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aus.^{18,19,64,81}

Vorteilhaft ist ebenfalls, daß relativ wenig Material benötigt wird, daß die Ergebnisse besser reproduzierbar sind als bei anderen Methoden und daß die Auswertung objektiver ist als zum Beispiel bei den immunhistochemischen Untersuchungen, da keine subjektive Beurteilung von Färbeintensitäten erforderlich ist. Mit Hilfe von FISH ist eine exakte Quantifizierung der Genkopienzahl möglich. Auf diese Weise können auch Amplifikationen auf einem niedrigen Niveau von 3 bis 8 Kopien pro Zelle entdeckt werden.^{64,81}

Des Weiteren besteht noch die Möglichkeit durch Vielfarben-FISH mehrere Genomabschnitte simultan in einer Zelle zu unterscheiden. Bei dieser Technik werden DNA-Proben mit verschiedenen Kombinationen von Haptenen und Fluorochromen markiert. In der vorliegenden Untersuchung wird die HER-2/neu Sonde mit Digoxigenin und das Anti-Digoxigenin mit Rhodamine markiert, so daß man eine der Kopienzahl entsprechende Anzahl roter Signale in den Zellkernen erhält. Die mit Biotin markierte α -Satelliten-17-Sonde ergibt dagegen durch Kopplung des Biotin bindenden Moleküls Avidin mit dem Fluorochrom FITC grüne Signale. Auf diese Weise ist es möglich sowohl die HER-2/neu Kopien quantitativ anzugeben, als auch die Chromosom 17 Anzahl pro Zellkern im Tumorgewebe zu bestimmen.

FISH erlaubt also eine Quantifizierung der Genkopienzahl in den Zellkernen unter Beibehaltung der Histomorphologie des Tumors, d.h. FISH kombiniert den Vorteil des direkten Gennachweises mit der genauen Lokalisation in morphologisch identifizierten Tumorzellen.^{18-20,23,81}

Nachteilig ist vor allen Dingen die Tatsache, daß FISH methodisch aufwendiger als die Immunhistochemie ist und eine gewisse Erfahrung des Untersuchers erfordert.

Bei der Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse wird im Bundesgebiet mit der Markteinführung von Herceptin[®] im Herbst 2000 folgende Einteilung verwendet: „0“ = negativ, d.h. keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als 10 % der Zellen, „1+“ = negativ, d.h. schwache Färbung von lediglich einem Teil der Membran in mehr als 10 % der Zellen,

„2+“ = Borderline, d.h. schwache bis moderate komplette Membranfärbung in mehr als 10 % der Zellen und „3+“ = positiv, d.h. starke komplette Membranfärbung in mehr als 10 % der Zellen. Während die Gruppen „0“ und „1+“ als eindeutig negativ, also nicht überexprimiert und die Gruppe „3+“ als eindeutig positiv, also überexprimiert zu werten sind, konnte die Wertigkeit des Ergebnisses „2+“ noch nicht endgültig geklärt werden.

Wir haben für die Auswertung unserer Untersuchungsergebnisse lediglich eine Einteilung in zwei Kategorien vorgenommen, nämlich einerseits keine/schwache Expression, entsprechend den Gruppen „0“, „1+“ und „2+“ und andererseits starke Expression entsprechend der Gruppe „3+“, d. h. der Gruppe der eindeutig überexprimierten Tumoren.

Im Gegensatz zur Immunhistochemie ist mit Hilfe von FISH eine genaue Angabe zum Grad der Amplifikation möglich. Durch Vergleich der beiden Methoden sollte geklärt werden, ob diese Quantifizierung der HER-2/neu Genkopienzahl zusätzliche prognostische Informationen liefert.

In den Studien 2 und 3 der *GBSG (German Breast Cancer Study Group)* wurden sowohl Chemo- als auch Hormon- und Bestrahlungstherapien als adjuvante Therapieformen angewendet. Die nodalpositiven Patientinnen erhielten jedoch alle entweder 3 oder 6 Zyklen CMF. Eine Unterteilung der Daten hinsichtlich der verschiedenen Therapiearme war aufgrund der zu geringen Patientenzahlen nicht möglich.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung des HER-2/neu Onkogens als starken unabhängigen Prognosefaktor bei CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen. Dies gilt sowohl für die Amplifikation des Gens als auch für die Überexpression des Genprodukts. Nicht nur in den univariaten sondern auch in den multivariaten Analysen waren das rezidivfreie Überleben und auch das Gesamtüberleben beim Vorliegen von HER-2/neu Amplifikation und Überexpression signifikant verkürzt.

Wie schon bei den früheren Untersuchungen an demselben Kollektiv festgestellt wurde, sind der ausgeprägte Effekt der HER-2/neu Amplifikation und

Überexpression bei den nodalpositiven Patientinnen und die durch die multivariaten Analysen belegte Unabhängigkeit als Prognosefaktor mit der Vorstellung einer Assoziation der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression mit einer CMF-Resistenz (CMF = Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil) vereinbar. Der Beweis für einen solchen Zusammenhang kann dabei im Rahmen dieser Studien nicht schlüssig erbracht werden, da kein vergleichbares nodalpositives Kollektiv ohne CMF-Therapie zur Verfügung stand.³⁴

Die bei unseren Untersuchungen ermittelten Prozentzahlen der HER-2/neu Amplifikation entsprechen den durchschnittlichen Ergebnissen anderer Untersucher (siehe Einleitung): Unter 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern fanden sich in 71 % der untersuchten Mammakarzinome und eine Amplifikation mit ≥ 8 Kopien in 29 %. Die Immunhistochemie ergab in 23 % der Fälle eine Überexpression.

Die Bedeutung dieser Erhöhung der Genkopienzahl, die in der Regel zu einer Überexpression des Genproduktes führt, wird aber nach wie vor kontrovers diskutiert. Während einige Autoren der HER-2/neu Amplifikation und/oder Überexpression keine prognostische Signifikanz zumessen^{13,36,60,83-85}, stellt sich das Onkogen in anderen Studien als starker unabhängiger Prognosefaktor dar. Dabei gilt diese prognostische Bedeutung nur in wenigen Untersuchungen unabhängig vom Nodalstatus, also sowohl für nodalpositive als auch nodalneegative Mammakarzinome.^{22,24,33,86} In den meisten Studien läßt sich das HER-2/neu Onkogen nur bezüglich der nodalpositiven Patientinnen als statistisch signifikanter Prognosefaktor bestätigen^{42,15,27,51-59}, wohingegen seine prognostische Potenz bei den nodalnegativen Mammakarzinomen offensichtlich nicht ausreichend ist.^{42,51,53-55,60-62,15-19,34,43}

Auch in den zuvor im Rahmen der Studien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich ein deutlich schwächerer Effekt des HER-2/neu Status bei den nodalnegativen Patientinnen, so daß in dieser Arbeit lediglich ein Teilkollektiv von 205 nodalpositiven Patientinnen untersucht wurde. Ziel war es dabei, die

prognostische Stärke des Onkogens bezüglich des rezidivfreien und Gesamtüberlebens herauszustellen und außerdem einen Vergleich zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen zur Expression und den durch FISH gewonnenen Angaben zur Genkopienzahl vorzunehmen, um herauszufinden, ob die quantitative Analyse des Amplifikationsgrades zusätzliche prognostische Information bedeutet.

Um die Bedeutung der Höhe der Amplifikation einzuschätzen, wurde zunächst eine Unterteilung in vier Gruppen vorgenommen: 1-2; 3-7; 8-22 und ≥ 23 HER-2/neu Genkopien. Dabei zeigte sich, daß der Amplifikation anscheinend ab einem Schwellenwert von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern eine prognostische Bedeutung zukommt. In wenigen Veröffentlichungen wurde bereits diskutiert, ob eine niedrige Amplifikation von 3-7 Kopien einen prognostischen Wert besitzt. Dies konnte noch nicht abschließend geklärt werden.^{18,19} In unseren Analysen bedeutete diese geringe Vermehrung der Genkopienzahl keinen signifikanten Unterschied bezüglich des rezidivfreien und Gesamtüberlebens im Gegensatz zu einem normalen HER-2/neu Gehalt. Ebenso ergab sich keine signifikante Verschlechterung der Prognose bei einer sehr hohen Amplifikation von ≥ 23 Kopien im Vergleich zu 8-22 Kopien. Aufgrund dieser deutlichen Trennung bei einer Amplifikation von ≥ 8 HER-2/neu Genkopien, scheint eine Unterteilung in zwei Gruppen sinnvoll: < 8 Kopien versus Amplifikation mit ≥ 8 Kopien. Auch Valeròn et al. haben schon die Existenz einer Schwelle der Amplifikation bei der Beurteilung der prognostischen Bedeutung des HER-2/neu für wahrscheinlich gehalten.³⁷

Zusätzlich zur Bestimmung der HER-2/neu Kopienzahl wurde eine quantitative Angabe zur Chromosom 17 Anzahl in den Tumorzellen gemacht. Auch in anderen mit Hilfe von FISH durchgeführten Untersuchungen wurde diese simultane Bestimmung vorgenommen.^{19,43,44} Dadurch ist einerseits die Differenzierung zwischen einer geringgradigen HER-2/neu Amplifikation und einer Polysomie des Chromosom 17 möglich und andererseits ermöglicht dieses Vorgehen die Angabe der HER-2/neu Kopienzahl pro Chromosom 17. Wir fanden dabei einen sehr starken Zusammenhang zwischen der absoluten HER-2/neu Kopienzahl pro

Zellkern und der HER-2/neu / Chromosom 17 - Ratio, so daß wir für unsere Analysen lediglich die Absolutwerte heranzogen.

Wie schon in anderen Untersuchungen findet sich auch in unseren Analysen eine sehr hohe Korrelation zwischen HER-2/neu Amplifikation und Überexpression^{14,19,22,34,37}: während bei negativer/schwacher Expression nur 11 % der Tumore eine Amplifikation ≥ 8 zeigen, sind es bei starker Expression 88 % und nur 12 % der Tumore mit starker Expression haben eine Genkopienzahl < 8 . Dementsprechend läßt sich in dieser Untersuchung sowohl für die Amplifikation als auch für die Überexpression eine hohe prognostische Relevanz des HER-2/neu bestätigen.

Unterschiede in den verschiedenen Studien ergeben sich weiterhin in bezug auf die prognostische Bedeutung der HER-2/neu Amplifikation bzw. Überexpression auf die rezidivfreie Überlebensrate einerseits und die Gesamtüberlebensrate andererseits. In einigen Studien fand sich lediglich für die Gesamtüberlebenszeit ein prognostischer Effekt, nicht dagegen für die rezidivfreie Überlebenszeit.^{34,52,87} Es wird allerdings auch von dem umgekehrten Fall berichtet, d.h. einer größeren Bedeutung bezüglich des rezidivfreien Überlebens.^{33,39,54,58} In den eigenen Untersuchungen bestätigte sich der prognostische Wert der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression sowohl für die rezidivfreie als auch die Gesamtüberlebensrate, was ebenfalls schon von einigen Autoren berichtet wurde.^{15,22,27,42,51,86,88}

Die Analyse der Assoziation der HER-2/neu Amplifikation und Überexpression mit anderen Prognosefaktoren beim Mammakarzinom ergibt in den verschiedenen Studien ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. So wird in den einigen Studien eine signifikante Korrelation zur Anzahl befallener Lymphknoten gefunden^{18,40}, was von anderen Autoren nicht bestätigt werden kann.^{16,22,39} Ähnliches gilt für den Tumorgrad, die Tumorgröße, das Alter der Patientin, DNA-Aneuploidie, eine erhöhte Zellproliferation, die Differenzierung des Tumors, usw.. Am durchgängigsten findet sich dabei eine inverse Korrelation zum Steroidhormonrezeptorstatus.^{15,17,18,39-41} In den eigenen Untersuchungen fand sich

ein leichter Zusammenhang zur Anzahl befallener Lymphknoten und zum Tumorgrad. Außerdem zeigte sich auch in unseren Analysen eine starke inverse Korrelation zum Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus.

Es existieren mittlerweile eine Reihe von Faktoren, die helfen sollen, individuelle Aussagen über die Prognose von Mammakarzinompatientinnen zu machen und somit eine risikoadaptierte adjuvante Therapieplanung durchzuführen. Die Stellung der einzelnen Prognosefaktoren ist dabei zum Teil noch ungeklärt. Relative Einigkeit herrscht in der Literatur darüber, daß die Beteiligung der axillären Lymphknoten den stärksten prognostischen Faktor darstellt. Die Ergebnisse einiger Untersucher legen nahe, daß die Bedeutung des HER-2/neu direkt an zweiter Stelle nach dem Lymphknotenstatus steht.^{16,22,42} Es gibt sogar Veröffentlichungen, die der Amplifikation des Onkogens einen größeren prognostischen Wert beimessen als dem Nodalstatus.^{18,39}

In den eigenen Analysen der anderen prognostischen Faktoren sind univariat die Anzahl befallener Lymphknoten, die Tumorgröße und die Hormonrezeptoren die stärksten Prognosefaktoren. Geringere Effekte zeigen noch der Tumorgrad und das Alter der Patientin. In den anschließenden multivariaten Analysen fand sich ein signifikanter Effekt der folgenden Faktoren: Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgröße und Progesteronrezeptorstatus. Diese wurden zur Adjustierung des Modells herangezogen, das die prognostische Bedeutung des HER-2/neu Onkogens in einer multivariaten Analyse klären soll. In vielen vorangegangenen Studien stellte sich HER-2/neu nur in den univariaten Analysen als unabhängiger Prognosefaktor dar. In den multivariaten Analysen ließ sich dieser Effekt häufig nicht bestätigen, da die Amplifikation bzw. Überexpression des Onkogens mit mehreren starken Prognoseparametern assoziiert ist.⁴⁹ In unseren Ergebnissen kommt es zwar nach Adjustierung für die Standardprognosefaktoren (Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgröße, Progesteronrezeptor) zu einer geringen Reduktion der in den univariaten Analysen erzielten Effekte, die HER-2/neu Amplifikation bzw. Überexpression stellt sich aber auch multivariat als unabhängiger Prognosefaktor dar. Aufgrund der oben bereits beschriebenen hohen Korrelation gilt dies sowohl für die Amplifikation als auch die Überexpression, wobei sich die

Membranfärbung in einer nicht adjustierten bivariaten Analyse als der leicht dominierende Faktor für die Kriterien rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit darstellte. In Bezug auf die Amplifikation fand sich ein Trend, der darauf hinweist, daß die Amplifikation zusätzliche prognostische Information liefert. Bei einer negativen/schwachen immunhistochemischen Färbeintensität bedeutet es offensichtlich eine Verschlechterung der Prognose, wenn die HER-2/neu Genkopienzahl erhöht ist. Dieser Effekt ist allerdings statistisch nicht signifikant, so daß in diesem Zusammenhang klärende Untersuchungen im Rahmen größerer Studien nötig sind.

5. Zusammenfassung

Die prognostische Bedeutung einer immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Überexpression bei CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen wird bereits in der Literatur diskutiert. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist einer der neueren methodischen Ansätze, um die HER-2/neu Genkopienzahl in Interphasekernen von Mammakarzinomen zu quantifizieren.

Die eigenen Untersuchungen wurden an Tumormaterial von 205 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen der Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* durchgeführt. Alle Patientinnen erhielten nach der Mastektomie mit Axilladissektion 3 oder 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluoruracil), wobei einige Subgruppen zusätzlich mit Tamoxifen oder Radiotherapie behandelt wurden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit bezüglich der rezidivfreien und der Gesamtüberlebenszeit betrug mehr als 8 Jahre. Für die Analysen an dem paraffineingebettetem Tumormaterial wurde zur Detektion der Amplifikation eine für das HER-2/neu Gen spezifische DNA-Sonde von Oncor[®] verwendet. Die Überexpression wurde immunhistochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper bestimmt.

Unsere Ergebnisse legen nahe, daß der HER-2/neu Amplifikation ab einem Schwellenwert von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern eine prognostische Bedeutung zukommt. Unter Annahme dieser Schwelle fanden wir in unseren Analysen mit Hilfe von FISH bei 29 % der untersuchten Mammakarzinome eine Amplifikation. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben in 23 % der Fälle eine Überexpression des HER-2/neu Proteins. Dabei bestätigte sich eine starke Korrelation zwischen Amplifikation und Überexpression ($r = 0,72$). Eine Diskrepanz fand sich in 11 % für Amplifikation ohne Überexpression und in 12 % für Überexpression ohne Amplifikation.

In den univariaten Analysen zeigten sowohl die Überexpression als auch die Amplifikation einen starken, statistisch signifikanten, prognostischen Effekt auf die rezidivfreie Überlebenszeit und die Gesamtüberlebenszeit. In der nicht

adjustierten bivariaten Analyse war die Membranfärbung der dominierende Faktor für beide Kriterien (RR ~ 2.0). Die Adjustierung für die Standardprognosefaktoren (Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgroße, Progesteronrezeptor) führte lediglich zu einer geringen Reduktion dieser Effekte.

Die Analyse der HER-2/neu Amplifikation scheint nach Einbeziehung der Proteinexpression in das Modell zusätzliche prognostische Information bezüglich der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit zu liefern, da es bei einer negativen/schwachen Expression offensichtlich eine Verschlechterung der Prognose bedeutet, wenn die HER-2/neu Genkopienzahl erhöht ist.

Die Frage, ob die Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu prädiktiv für eine erhöhte Gefahr einer CMF-Resistenz bei Mammakarzinompatientinnen zu werten ist oder nicht, kann in dieser Studie nicht geklärt werden. In diesem Zusammenhang sind zukünftig prospektiv randomisierte Studien nötig.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen also den prognostischen Wert sowohl der HER-2/neu Amplifikation als auch der Überexpression für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben von CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen. Die vermutlich vorhandene zusätzliche Bedeutung einer Amplifikation bei Abwesenheit von Überexpression bedarf weiterer Untersuchungen an größeren Patientinnenkollektiven.

6. Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. H. Bojar, Direktor des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, der den Anstoß zu dieser Arbeit gab und ihre Durchführung überhaupt erst möglich machte.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Onkologische Chemie, vor allem meiner Betreuerin, Frau Dr. Kornelia Martin, für ihre Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. C. Schmoor und Herrn Prof. Dr. M. Schumacher, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie und Medizinische Informatik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, die im Rahmen der multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der *GBSG* die statistische Auswertung unserer Ergebnisse vornahmen.

Schließlich möchte ich noch meinem Bruder, Kay Bente, herzlich danken, der nie müde wurde mich bei der Gestaltung dieser Arbeit tatkräftig zu unterstützen und meinem Freund, Peter Sommer, der mir bei der Umsetzung dieser Arbeit mit viel Geduld zur Seite stand.

7. Literatur

1. Studienprotokoll der Studie 2: Chemo-Hormon-Therapie; März 1984
2. Studienprotokoll der Studie 3: CMF versus CMF-Bestrahlung-CMF; März 1984
3. Anhang zum Studienprotokoll der Studien 2 und 3; März 1984
4. Schumacher M, Bastert G, Bojar H: A randomized clinical trial evaluating the duration of chemotherapy in patients with primary node-positive breast cancer; S.E. Slalomon: Adjuvant Therapy of Cancer 7: 193-203 1993
5. Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome, 7. Auflage, 1998
6. Schünemann, Possinger, Scheidel, Willich: Gynäkologische Malignome, Tumortherapie und Nachsorge bei Mamma- und Genitalmalignomen; W.Zuckschwerdt Verlag, 1995
7. Rubens RD: Selection of patients for adjuvant systemic therapy (Meeting abstract); 12th Annual International Breast Cancer Conference: March 16-18, 1995; Mia:1996
8. Clark GM: Do we really need prognostic factors for breast-cancer; Breast Cancer Research and Treatment 30: 117-126, 1994
9. Dhingra K, Hortobagay GN: Critica evaluation of prognostic factors; Seminars in Oncology 23: 436-445, 1996
10. Human Gene Mapping 11; 1991, London Conference (1991) Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping; Cytogenet. Calf Genet., Solomon E, Rawlings C, eds., Karger, New York, 58 (1-4): 702
11. De Potter CR, Schelfhout AM: The neu-protein and breast cancer; Virchows Archiv 426: 107-115, 1995
12. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harvey H, Demers L, Lipton A: Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer; J Clin Oncol 13: 1129-1135, 1995
13. Berns EM, Foekens JA, van Staeveren IL, van Putten WL, de Koning HY, Portenegen H, Klijn JG: Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment; Gene 159 : 11-18, 1995

14. Stal O, Sullivan S, Wingren S, Skoog L, Rutqvist LE, Carstensen JM, Nordenskjöld B.: C-erbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer; *Eur J Cancer* 31A: 2185-2190, 1995
15. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, Martinez-Tello F, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Bürki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn HJ for the International (Ludwig) Breast Cancer Study Group: Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer; *J Clin Oncol* 10: 1049-1056, 1992
16. Gai M, Roagna R, Ponzoni R, de Bortoli M, Dati C, Sismondi P: Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer; *Anticancer Research* 14: 1441-1450, 1994
17. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirringione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, Henderson C : c-erbB.2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer; *N Engl J Med* 330: 1260-1266, 1994
18. Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF: FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer; *Breast Cancer Research and Treatment* 39: 203-212, 1996
19. Sauter G, Feichter G, Torhorst J, Moch H, Novotna H, Wagner U, Dürmüller U, Waldmann FM: Fluorescence in Situ Hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies; *Acta Cytologica* 40: 164-173, 1996
20. Murphy DS, Hoare SF, Going JJ, Mallon EEA, George WD, Kaye SB, Brown R, Black DM, Keith WN : Characterization of extensive genetic alterations in ductal carcinoma in situ by Fluorescence in situ Hybridization and molecular analysis; *J Natl Cancer Inst* 87: 1694-1704, 1995
21. Harris L, Tang C, Yang D, Lupu R: Induction of chemotherapy sensitivity in MCF-7 breast cancer cells by heregulin (Meeting abstract); *Proc Annu Mee. Am Assoc Cancer Res*,36: A2539 1995ISSN: 0197-016x. 1996
22. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JRC, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CHW: Expression of c-erbB.2 Oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer; *Cancer Res* 49: 2087-2090, 1989
23. Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR: Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH); *Deutsches Ärzteblatt* 92, Heft 22, 2. Juni 1995

24. Molland JF, Barraclough BH, Gebiski V, Miliken J, Bilous M :
Prognostic significance of c-erbB-2 in axillary node-negative breast cancer; Australian and New Zealand J Surgery , 66: 64-70,1995
25. Hayes DF, Henderson IC, Shapiro CL: Treatment of metastatic breast cancer: Present and future prospects; Seminars in Oncology 22: 5-19, 1995
26. Borg A, Baldetrop B, Fernoe M, Killander D, Olsson H, Ryden S, Sigurdsson H: ErbB-2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer; Cancer Letters 81: 137-144, 1994
27. Tetu B, Brisson J: Prognostic significance of Her-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of immunostaining and adjuvant therapy; Cancer 73: 2359-2365, 1994
28. Paik S: Clinical significance of erbB-2 (Her-2/neu) protein; Cancer Investigation 10: 575-579, 1992
29. Swain SM: Growth factors and their receptors for prognosis and potential therapy (Meeting abstract); 12th Annual International Breast Cancer Conference; March 16-18, 1995, Mia: 1996
30. Lin RJ, Brink J, Xuan JA, Langton-Webster BC: An antibody directed against the c-erbB-2 protein enhances the inhibitory activity of tamoxifen against estrogen-dependent c-erbB-2 expressing breast tumor cell lines (Meeting abstract); Breast Cancer Res Treat 32 (Suppl.): 31. 1994ISSN0167-6806. 1996
31. Witters L, Kumar R, Chinchilli V, Lipton A: An enhanced inhibitory effect of the combination of tamoxifen plus HER-2/neu antibody on human breast carcinoma cells (Meeting abstract); Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 36: A2552. 1995ISSN: 0197-016x, 1996
32. Hayes DF: Should we treat her, too?; J Clin Oncol 14: 697-699, 1996
33. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P: Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer; J Clin Oncol 11:1936-1942, 1993
34. Ravdin PM, Chamness GC: The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers - a review; Gene 159: 19-27, 1995
35. Bojar H, Schmoor C, Sauerbrei W, Zumschilde A, Struse K, Schumacher M, Bastert G: Prognostic Impact of HER-2/neu Overexpression in Node-Positive Breast Cancer treated with CMF - Results of a Standardized GBSB Trial;

36. Shackney SE, Smith CA, Pollice AA, Janocko LE, Singh SG, Groft DW, Brown KA, Hartsock RJ : Preferred genetic evolutionary sequences in human breast cancer: a case study; *Cytometry* 21: 6-13, 1995
37. Valeròn PF, Chirino R, Fernandez L, Torres S, Navarro D, Aguiar J, Cabrera JJ, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC: Validitation of a differential PCR and an ELISA procedure in studying HER-2/neu status in breast cancer; *Int. J. Cancer* 65: 129-133, 1996
38. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L: Immunohistochemical Detection of HER-2/neu in patients with axillary node negative breast carcinoma; *Cancer* 75: 1320-1326, 1995
39. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A Jager W: Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients; *Breast Cancer Res. Treat.* 43 87-95, 1997
40. Huang CS, Chen YC, Wang M, Lin JK, Chang KJ: HER-2/neu overexpression in Chinese breast cancer: correlation with other prognostic factors; *J Formos Med. Ass.* 94:660-665, 1995
41. Brower ST, Ahmed S, Tartter PI, Bleiweiss I, Amberson JB: Prognostic variables in invasive breast cancer: contribution of comedo versus noncomedo in situ component; *Annals of Surgical Oncology* 2: 440-444, 1995
42. Slamon DJ, Godolphin W, Jones L, Holt JA, Keith DE: Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in human breast and ovarian cancer; *Science* 244: 707-712, 1989
43. Murphy DS, McHardy P, Coutts J, Mallon EA, George WD, Kaye SB, Brown R, Keith WN: Interphase cytogenetic analysis of erbB-2 and topoII α co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ; *Int. J. Cancer* 64: 18-26, 1995
44. Szöllosi J, Balázs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM: ErbB-2 (HER-2/neu) gene copy number, p185^{HER-2} overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer; *Cancer Research* 55: 5400-5407, 1995
45. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations; *Journal of the American Statistical Association* 53: 457-481, 1958
46. Cox DR: Regression models and life tables (with discussion); *Journal of the Royal Statistical Society B* 34: 187-220, 1972
47. Marubini E, Valsecchi MG: Analysing survival data from clinical trials and observational studies; John Wiley and Sons, Inc. New York, 1995

48. Altman D: Practical statistics for medical research; Chapman & Hall, London, 1991
49. Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP: ERBB2 Oncogene in Human Breast Cancer and its Clinical Significance; Eur J Cancer, Vol. 34, No.: 791-808, 1998
50. Tzahar E, Yarden Y: The ErbB-2 / HER-2/neu oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands; Biochimica et Biophysica Acta 1377: M25-M37. 1998
51. Tandon AK, Clark GM, Chamnes GC, Ullrich A, McGuire WL: HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer; J Clin Oncol 7: 1120-1128, 1989
52. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ: Association of c-erbB2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor longterm survival in breast cancer; Int J Cancer 49: 650-655, 1991
53. Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JFR, Bell J, Nicholson R: C-erbB2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer; Br J Cancer 63: 439-443, 1991
54. O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, Bartkova J, Gregory WM, Richards MA: The relationship between c-erbB2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer; Br J Cancer 63: 444-446, 1991
55. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R: Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors; Int J Cancer 49: 44-49, 1991
56. Hartmann LC, Angle JN, Wold LE, Farr GH, Grill JP, Su JQ: Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer; Cancer 74: 1956-1963, 1994
57. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M: The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases; Br Cancer Res Treat 35: 283-291, 1995
58. Anbazhagan R, Gelber RD, Bettelheim R, Goldhirsch A, Gusterson BA: Association of c-erbB2 expression and S-phase fraction in the prognosis of node positive breast cancer; Ann Oncol 2: 47-53, 1991
59. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SAW: HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer; Cancer Res 50: 4332-4337, 1990
60. Thor AD, Schwartz LH, Koerner FC: Analysis of c-erbB2 expression in

- breast carcinomas with clinical follow-up; *Cancer Res* 49: 7147-7152, 1989
61. Richner J, Gerber HA, Locher GW: C-erbB2 protein expression in node negative breast cancer; *Ann Oncol* 1: 263-268, 1990
 62. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Malura S, Palma PD, Caffo O: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinomas; *J Clin Oncol* 12: 454-466, 1994
 63. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK: HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma; *J Clin Oncol* 2: 47-53, 1992
 64. Ross JS, Fletcher JA: The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy; *Cancer Biology* Vol. 9: 125-138, 1999
 65. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A: p185^{HER2} monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor; *Mol Cell Biol* 9: 1165-1172, 1989
 66. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C: Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185^{HER2} monoclonal antibodies; *Cancer Immunol Immunother* 37: 255-263, 1993
 67. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J: Recombinant humanized anti-HER2 antibody (HerceptinTM) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts; *Cancer Res* 58: 2825-2831, 1998
 68. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis Ca, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IX, Norton L: Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized p185^{HER2} monoclonal antibody in patients with HER-2/neu overexpressing metastatic breast cancer; *J Clin Oncol* 14: 737-744, 1996
 69. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy: Efficacy and safety of Herceptin[®] (humanized anti-human HER-2 antibody) as a single agent in 222 women with HER-2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer; *Proc ASCO* 17:97a, 1998
 79. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S: Addition of Herceptin[®] (humanized anti HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial; *Proc ASCO* 17:98a,

1998

80. Reese DM, Slamon DJ: HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer; *Stem Cells* 15: 1-8, 1997
81. Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Pölcher M, Kuhn W, Ulm W, Graeff H, Schmitt M: HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer; *Int J of Oncol* 14: 662-671, 1999
82. Mezzelani A, Alasio L, Bartoli C, Bonora MG, Pierotti MA, Rilke F, Pilotti S: c-erbB2/neu gene and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytologica fine-needle aspirates; *Br J of Cancer* 80: 519-525, 1999
83. Clark GM, McGuire WL: Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer; *Cancer Res* 51: 944-948, 1991
84. Kury F, Sliutz G, Schemper M: HER-2/neu oncogene amplification and overall survival of breast carcinoma patients; *Eur J Cancer* 26A: 946-949, 1990
85. Dati C, Muraca R, Tazartes O: C-erbB-2 and ras expression levels in breast cancer are correlated and show a co-operative association with unfavorable clinical outcome; *Int J Cancer* 47: 833-838, 1991
86. Gullick WJ, Love SB, Wright C: C-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes; *Br J Cancer* 63: 434-438, 1991
87. McCann AH, Dervan PA, O'Regan M: Prognosis significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer; *Cancer Res* 51: 3296-3303, 1991
88. Walker RA, Gullick WJ, Varley JM: An evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as marker of poor short-term prognosis in breast cancer; *Br J Cancer* 60: 426-429, 1989
89. Öztürk M, Bolkent S, Yilmazer S, Kaner G, Ünal H: Detection of c-erbB2 mRNAs using dig-labelled oligonucleotide probe with in situ hybridisation in human breast carcinomas: Comparison with immunohistochemical results; *Anal Cell Pathol* 16: 201-209, 1998
90. De Laurentis M, Arpino G, Massarelli E, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, Bianco AR, De Placido S; Università Fedelico II, Napoli, Italy: A metaanalysis of the interaction between HER-2 and the response to endocrine Therapie (ET) in metastatic breast cancer (MBC); *ASCO* 2000

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 09.05.1974
Geburtsort: Gevelsberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Kofession: evangelisch

Schulausbildung:

1980 – 1984: Grundschule Voerde-Nord in Ennepetal
1984 – 1993: Reichenbach-Gymnasium in Ennepetal
1993: Abitur

Studium der Humanmedizin:

1993: Beginn des Studiums an der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg

1994 – 1996: Vorklinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf;
1996: Physikum

1996 – 1999: Klinischer Studienabschnitt an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf;
1997: 1. Staatsexamen
1999: 2. Staatsexamen

1999 – 2000: Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Neuss, Lukaskrankenhaus;
Wahlfach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
2000: 3. Staatsexamen

Weiterbildung:

seit Januar 2001: Ärztin im Praktikum an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Städtischen Kliniken Neuss, Lukaskrankenhaus

Prognostische Bedeutung der Quantifizierung der HER-2/neu Genkopienzahl mit Hilfe von FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) im Vergleich zur immunhistochemischen Bestimmung der Überexpression bei nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen

vorgelegt von: Claudia Bente

Die prognostische Bedeutung einer immunhistochemisch bestimmten HER-2/neu Überexpression bei CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinom-patientinnen wird bereits in der Literatur diskutiert. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist einer der neueren methodischen Ansätze, um die HER-2/neu Genkopienzahl in Interphasekernen von Mammakarzinomen zu quantifizieren.

Die eigenen Untersuchungen wurden an Tumormaterial von 205 nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen der Therapiestudien 2 und 3 der *German Breast Cancer Study Group (GBSG)* durchgeführt. Alle Patientinnen erhielten nach der Mastektomie mit Axilladisektion 3 oder 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluoruracil), wobei einige Subgruppen zusätzlich mit Tamoxifen oder Radiotherapie behandelt wurden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit bezüglich der rezidivfreien und der Gesamtüberlebenszeit betrug mehr als 8 Jahre. Für die Analysen an dem paraffineingebettetem Tumormaterial wurde zur Detektion der Amplifikation eine für das HER-2/neu Gen spezifische DNA-Sonde von Oncor[®] verwendet. Die Überexpression wurde immunhistochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper bestimmt.

Unsere Ergebnisse legen nahe, daß der HER-2/neu Amplifikation ab einem Schwellenwert von ≥ 8 HER-2/neu Kopien pro Zellkern eine prognostische Bedeutung zukommt. Unter Annahme dieser Schwelle fanden wir in unseren Analysen mit Hilfe von FISH bei 29 % der untersuchten Mammakarzinome eine Amplifikation. Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben in 23 % der Fälle eine Überexpression des HER-2/neu Proteins. Hierbei bestätigte sich eine starke Korrelation zwischen Amplifikation und Überexpression ($r = 0,72$). Eine Diskrepanz fand sich in 11 % für Amplifikation ohne Überexpression und in 12 % für Überexpression ohne Amplifikation. In den univariaten Analysen bestätigte sich sowohl für die Überexpression als auch für die Amplifikation ein starker, statistisch signifikanter, prognostischer Effekt auf die rezidivfreie Überlebenszeit und die Gesamtüberlebenszeit. In der nicht adjustierten bivariaten Analyse war die Membranfärbung der dominierende Faktor für beide Kriterien (RR $\sim 2,0$). Die Adjustierung für die Standardprognosefaktoren (Tumorgröße, Tumorgrad, Alter der Patientin, Anzahl befallener Lymphknoten, Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor) führte lediglich zu einer geringen Reduktion dieser Effekte.

Die Analyse der HER-2/neu Amplifikation scheint nach Einbeziehung der Proteinexpression in das Modell zusätzliche prognostische Information bezüglich der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit zu liefern, da es bei einer negativen/schwachen Expression offensichtlich eine Verschlechterung der Prognose bedeutet, wenn die HER-2/neu Genkopienzahl erhöht ist.

Die Frage, ob die Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu prädiktiv für eine erhöhte Gefahr einer CMF-Resistenz bei Mammakarzinompatientinnen zu werten ist oder nicht, kann in dieser Studie nicht geklärt werden. In diesem Zusammenhang sind zukünftig prospektiv randomisierte Studien nötig.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen also den prognostischen Wert sowohl der HER-2/neu Amplifikation als auch der Überexpression für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben von CMF-therapierten nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen. Die vermutlich vorhandene zusätzliche Bedeutung einer Amplifikation bei Abwesenheit von Überexpression bedarf weiterer Untersuchungen an größeren Patientinnenkollektiven.

Gez.: Prof. Dr. med. H. Bojar

