

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Helmut Erich Gabbert

Zusammenhang zwischen Chromosom 17 Polysomie, HER2- neu Status und p53-
Expression bei invasiven Mammakarzinomen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Andrea Christians

2007

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Schulte-Osthoff

Für meine Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1 InhaltsverzeichnisIII

2 Einleitung.....5

 2.1 Die Bedeutung von HER2-neu für den Tumorprogress.....5

 2.1.1 Die HER-Familie.....6

 2.1.2 HER2-neu und Chromosom 176

 2.2 Die Bedeutung von p537

 2.2.1 Funktion des p53 Proteins.....7

 2.2.2 p53 und Chromosom 178

 2.3 Prognostische Faktoren.....9

 2.3.1 Morphologische Faktoren.....9

 2.3.2 Molekulare Marker und Genetische Faktoren10

3 Ziele der Dissertation.....12

4 Material Methoden.....13

 4.1 Untersuchungsmaterial und darauf bezogene Patientendaten.....13

 4.1.1 Klassifikation und Einteilung der Mammacarcinome15

 4.2 Immunhistochemische Färbungen.....15

 4.2.1 Herstellung und Vorbereitung der Gewebeschnitte.....15

 4.2.2 Nachweis der Antigene.....16

 4.2.3 Prinzip des HercepTest®- Verfahrens und Charakterisierung des Antikörpers
 HER2-neu17

 4.2.4 Charakterisierung des Antikörpers p53 zur immunhistochemischen Färbung21

 4.3 FISH (Fuoreszenz In Situ Hybridisierung)22

 4.3.1 Grundlagen der Methode.....22

 4.3.2 Vorbereitung22

 4.3.3 Durchführung.....22

 4.3.4 Auswertung.....24

 4.4 Statistik25

4.4.1	Datenverarbeitung und Dokumentation.....	25
4.4.2	Überblick über die verwendeten Verfahren	25
4.4.3	Überblick über die verwendeten Testverfahren zur Bestimmung der Statistischen Signifikanz und kurze Erläuterung der Zielsetzung	26
5	Ergebnisse.....	27
5.1	Chromosom 17 Polysomie bei HER2-neu Überexpression.....	27
5.2	Unterschiede zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen im Bezug auf die prognostischen Parameter und p53 Expression	27
5.3	Unterschiede zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen im Bezug auf die prognostischen Parameter und p53 Expression unter Berücksichtigung der Amplifikation des HER2 Gens	30
6	Diskussion	38
6.1	Bedeutung von HER2-neu für das invasive Mammacarcinom	38
6.2	Bedeutung von p53 für das invasive Mammacarcinom	39
6.3	Die Bedeutung einer Polysomie des Chromosom 17 im Zusammenhang mit HER2-neu und p53 für das invasive Mammacarcinom	39
6.4	Beziehung zwischen CEP17 Polysomie und Östrogen-und Progesteronrezeptor- Status	42
6.5	Beziehung zwischen CEP17 Polysomie und den histopathologischen Prognosefaktoren	43
6.6	Bedeutung der Chromosom 17 Polysomie für die Bestimmung des HER2-neu Status mit der FISH- Methode	44
7	Schlussfolgerungen	46
8	Zusammenfassung	47
9	Literaturverzeichnis	49
10	Danksagung	62
11	Lebenslauf.....	63

2 Einleitung

Als invasives Mammakarzinom wird eine Gruppe maligner epithelialer Tumoren der Brustdrüse bezeichnet, die infiltrierend wachsen und eine ausgeprägte Tendenz zur Fernmetastasierung aufweisen. In der überwiegenden Mehrheit handelt es sich um Adenocarcinome, die nach heutiger Ansicht vom Epithel des Mammaparenchyms, speziell des terminalen duct lobular units (TDLU) ausgehen (Tavassoli FA, Devilee P (Eds.) 25).

Das invasive Mammacarcinom ist das häufigste Carcinom der Frau und macht weltweit 22%, 26 % in den Industrienationen Nordamerikas, Europas und Australiens aus. In Deutschland erkranken jährlich mehr als 50100 Frauen neu, entsprechend 26,8% aller Krebsneuerkrankungsfälle. Mehr als 23200 Frauen, entsprechend 40%, sind jünger als 60 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit ca. 62 Jahren knapp 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Krebs insgesamt (Tavassoli FA, Devilee P (Eds.); 24,25).

2.1 Die Bedeutung von HER2-neu für den Tumorprogress

Es ist bekannt, dass das Proteinprodukt des HER2-neu Gens, der Rezeptor HER2, in 20-30% der Mammacarcinome überexprimiert wird (Witton CJ, Breast Cancer Research, 2003,5:206-207). Seit nahezu 20 Jahren ist in Studien eine Assoziation einer HER2-neu Überexpression und/oder Amplifikation des HER2 Gens mit einer schlechten Prognose nachgewiesen worden (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al.; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al.; 5,6). Für die Therapie des Mammacarcinoms stellte die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), der gegen die extrazelluläre Domäne des HER2 Rezeptors gerichtet ist, einen bedeutenden Fortschritt dar. Zunächst nur im fortgeschrittenen metastasierten Stadium eingesetzt, haben die 2005 veröffentlichten Ergebnisse zweier grosser Studien gezeigt, dass bei HER2 positiven Mammacarcinomen das krankheitsfreie Überlebensintervall durch die Gabe von Trastuzumab für ein Jahr nach adjuvanter Chemotherapie signifikant verlängert wird (Piccart-Gebhart MJ et al. 8), und bei operiertem HER2 positivem Mammacarcinom die Prognose durch die Gabe von Trastuzumab zusätzlich zu adjuvanter Chemotherapie verbessert wird (Romond EH et al.; 9). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass eine HER2 Amplifikation mit einem Ansprechen auf eine Anthracyclinhaltige Chemotherapie assoziiert ist (Pritchard KI et al.; 10). In der letzten Zeit richtet sich der Fokus von Studien immer wieder auf den Einfluss eines positiven HER2 – Status auf das Ansprechen einer endokrinen Therapie bei ER+

Mammacarcinom (Ellis MJ, Coop A, Singh B, et al., Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S et al.; 79, 80). Es hat sich gezeigt, dass das Brustkrebswachstum durch Interaktionen zwischen den durch den ER und verschiedene Wachstums-Faktor-Rezeptoren, besonders HER1 und HER2, induzierten Signalkaskaden reguliert wird. Dies führt dazu, dass der Östrogen – Antagonist Tamoxifen bei Tumoren, die HER2 überexprimieren, seine Effektivität verliert, und sogar eine Funktion als Östrogen-Agonist mit resultierender Wachstumsstimulation entwickelt. Dieser Effekt kann durch den Einsatz von Aromatase-Inhibitoren erfolgreich unterbunden werden, da diese die Östrogenproduktion hemmen und so durch den Entzug seines Liganden den ER inaktivieren (Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R; 81).

2.1.1 Die HER-Familie

Zu der HER-Familie gehören vier Gene, die für vier homologe Tyrosinkinase-Rezeptoren kodieren: HER1 bzw. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (cErbB2, neu), HER3 und HER4. Die Rezeptoren befinden sich in der Zellmembran und haben eine ähnliche Struktur. Der wesentliche Unterschied zwischen HER2 und den anderen Rezeptoren besteht darin, dass HER2 keinen bekannten Liganden aufweist und bei Überexpression Homo-Dimere ausbilden kann. Die anderen drei Rezeptoren haben dagegen mehrere bekannte Liganden, die bei der Bindung an die entsprechende Domäne die Ausbildung von Dimeren bewirken. HER Rezeptoren können sowohl mit gleichartigen als auch mit unterschiedlichen Mitgliedern der HER Familie eine Bindung eingehen, also Homo-oder Heterodimere ausbilden. HER2 ist dabei der bevorzugte Partner (Graus-Porta D et al.; 16). Das Ergebnis dieser Dimerisierung führt zu einer Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne mit nachfolgender Übermittlung eines Wachstumssignals an den Zellkern und darüber zum Tumorstadium (Witton CJ; 7).

2.1.2 HER2-neu und Chromosom 17

Das HER2 Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q21) lokalisiert. Die Expression des Gens wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen gesteuert. Im normalen Mammagewebe erfolgt eine Aktivierung der Transkription des HER2 Gens, wohingegen bei mehr als 90% aller Mammacarcinome, die eine Überexpression des HER2-Proteins aufweisen, eine Amplifikation des HER2 Gens zugrunde liegt. Wenn man davon ausgeht, dass eine Amplifikation des HER2 Gens über eine gesteigerte Gen-Dosis zu einer Überexpression des HER2 Proteins führt, dann ist denkbar, dass auch durch eine erhöhte Anzahl der Kopien des Chromosoms 17 (Polysomie) eine Steigerung der Gen- Dosis erreicht wird. Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang

die Tatsache, dass eine beträchtliche Anzahl von Mammacarcinomen eine Chromosom 17 Aneusomie mit entweder polysomen oder hypodisomen Chromosomensätzen aufweisen (Wang S et al.; 11). Die Beziehung zwischen einer HER2 Protein Überexpression und einer Polysomie des Chromosoms 17 ist auch gegenwärtig Gegenstand von Untersuchungen (Downs-Kelly E et al.; 12).

2.2 Die Bedeutung von p53

Dem TP53 Gen, das den Transkriptionsfaktor p53 codiert, kommt eine zentrale Bedeutung für die Wahrung der Stabilität des Genoms zu. Ein Verlust des Gens ist wahrscheinlich die häufigste Veränderung eines einzelnen Gens bei Tumoren (Soussi T; 62; Soussi T, Beroud C, 63). Das p53 Protein wird daher auch als "Wächter des Genoms" (Vousden KH, 91) bezeichnet. Bei Mammacarcinomen sind besonders Mutationen des TP53 Gens mit einer schlechten Prognose und Resistenz gegen eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie in Verbindung gebracht worden (Bergh J, Norberg T et al.; 48, Aas T, Borresen AL et al.; 50, Geisler S, Lonning PE, Aas T et al.; 51, Pharoah PD, Day N et al.; 58).

2.2.1 Funktion des p53 Proteins

Normalerweise resultiert aus einer irreversiblen Beschädigung der DNA ein Arrest des Zellzyklus und die Auslösung des programmierten Zelltodes, die Apoptose. Bei diesen Vorgängen kommen p53 entscheidende Funktionen zu. Normalerweise ist die p53 Konzentration in der Zelle niedrig, da das Genprodukt schnell abgebaut wird. Das MDM2-Protein bindet p53, regelt seinen Abbau und übt so eine negative Kontrollfunktion über die p53 Konzentration aus. Wenn durch die Signale einer Reihe von zellulären Stresssensoren eine Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 eintritt, wird diese Kontrolle aufgehoben und es kommt zu einer intranukleären Akkumulation von p53 und seiner Aktivierung als Transkriptionsfaktor. Dies führt zu einer erhöhten Konzentration einer Gruppe von Genen, die den Zellzyklus hemmen (WAF1, GADD45, 14-3-3S, CyclinG), die Apoptose induzieren (FAS/APO/CD95, KILLER/DR5, AIF1, PUMA, BAX, PIG3) und für die DNA Reparatur zuständig sind (MLH2, O6MGMT). Tumorzellen, denen p53 fehlt oder die ein in seiner Funktion durch Mutation verändertes p53 aufweisen, können so trotz beschädigter DNA ihre Replikation fortsetzen und entgehen der Apoptose. (Strachan/Read; 26; Wang XW, Harris CC; 83, Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA ;84, Harris CC ;85)

2.2.2 p53 und Chromosom 17

Die p53 Funktion kann durch eine Deletion, Mutationen oder die Inaktivierung durch einen Inhibitor wie MDM2 verloren gehen. Das TP53 Gen ist in der p12-Region des Chromosoms 17 lokalisiert. In dieser Region geht bei einem breiten Spektrum von Tumoren, insbesondere auch beim Mammacarcinom, die Heterozygotie am häufigsten verloren. In den meisten sporadischen Tumoren ist das TP53 Gen häufig mutiert. 25% aller sporadischen Mammacarcinome weisen mutiertes TP53 auf. Keimbahnmutationen des TP53 werden beim Li-Fraumeni-Syndrom dominant vererbt. (26, Guran S, Tunca Y, Imirzalioglu N; 86)

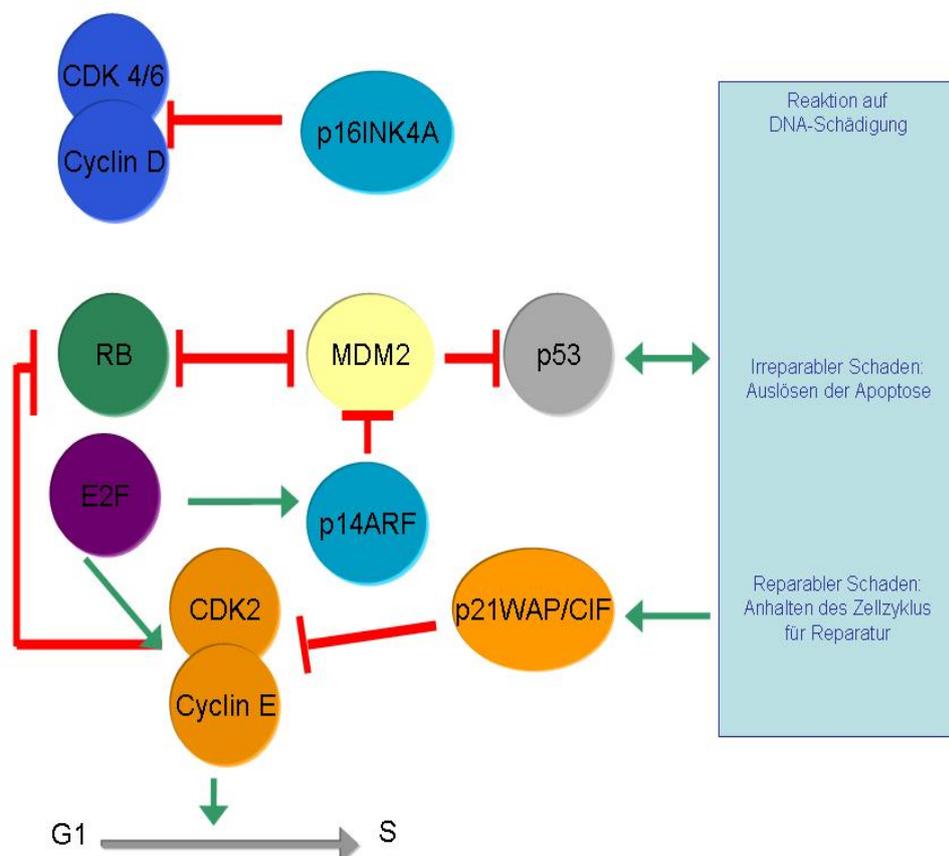


Abbildung 1. Kontrollen für den Fortgang des Zellzyklus und die genomische Integrität (modifiziert nach Strachan und Read)

2.3 Prognostische Faktoren

Die traditionellen patho-morphologischen Faktoren sind bisher die brauchbarsten Prognosefaktoren (Fitzgibbons et al.; 30). Neuerdings gewinnt die Methode des Gene Expression Profiling zunehmend an Bedeutung (Bertucci et al. 2002; 27, van 't Veer et al 2002; 28, van de Vijver et al 2002, 29)

2.3.1 Morphologische Faktoren

2.3.1.1 Nodal Status

Der Status der axillären Lymphknoten stellt den wichtigsten Prognosefaktor für Patienten mit Mammacarcinom dar. In zahlreichen Studien konnte eine inverse Relation zwischen der Gesamt-Überlebensrate und dem krankheitsfreien Intervall und der Anzahl der axillären Lymphknotenmetastasen gezeigt werden (Fisher et al. 1993; 40, 41, Chen&Schnitt 1998; 46, Bundred 2001; 44).

2.3.1.2 Tumorgrösse

Die Tumorgrösse stellt einen wichtigen Prognosefaktor dar. Selbst bei Tumoren, die 1 cm oder kleiner sind, entsprechend einem Stadium T1a und T1b nach der TNM Klassifikation, hat die Grösse einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung axillärer Lymphknotenmetastasen und den Krankheitsverlauf (Elston CW et al.;31, Fisher ER et al.;32, Carter CL, Allen C, Henson DE ; 33, Neville AM et al.;34, Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L ;39).

2.3.1.3 Histologischer Typ

Einige spezielle histologische Typen des Mammacarcinoms sind mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Dazu gehören das tubuläre, cribriforme, muzinöse und das adenoid-zystische Carcinom. (Dixon JM, Page DL, Anderson TJ et al ;35, Dawson P, Ferguson DJ, Karrison T; 36, Pereira H et al.; 37, Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L ;39) Auch die intracystische Sonderform des papillären Carcinoms verhält sich prognostisch günstig (Leal C et al.;54)

2.3.1.4 Histologischer Grad

Schlechtere Überlebensraten und eine höhere Rate für Fernmetastasen werden unabhängig von der Tumorgrösse und dem Nodal Status bei Patienten mit G3 Tumoren beobachtet (Elston CW, Ellis IO; 14, Pereira H, et al.; 37).

2.3.1.5 Angioinvasion

Es konnte gezeigt werden, dass eine Lymphangioinvasion besonders bei T1 N0 Tumoren einen wichtigen und unabhängigen Prognosefaktor darstellt. Hämangioinvasion soll mit einem ungünstigen Effekt auf den klinischen Verlauf verbunden sein; allerdings ist die Streubreite der berichteten Inzidenz sehr gross (weniger als 5% bis fast 50%) (Tavassoli FA, Devilee P (Eds.); 25, Roses DF et al.; 38).

2.3.2 Molekulare Marker und Genetische Faktoren

Inzwischen konnte beim invasiven Mammacarcinom eine grosse Anzahl genetischer Alterationen nachgewiesen werden, die teilweise eine prognostische Relevanz hinsichtlich des Überlebens aufweisen (Bertucci F et al.; 27). Andere präzisieren die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf bestimmte Therapiemodalitäten.

2.3.2.1 Steroid Hormon Rezeptoren (Östrogen- und Progesteron- Rezeptor)

Der Nachweis der Hormonrezeptoren gehört seit etwa 20 Jahren zu den Standarduntersuchungen (Osborne CK; 57). Ungefähr 60% aller Mammacarcinome exprimieren den Östrogenrezeptor (ER). Östrogen bindet an den im Zellkern lokalisierten ER und induziert so eine Expression von Genen, die die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen steuern. Der ER stellt neben einem Prognosefaktor in erster Linie einen wichtigen prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie dar. Der Progesteronrezeptor (PR) dient als Ersatzmarker für den Nachweis eines aktiven ER, da er unter dem Einfluss des durch Östrogen aktivierten ER gebildet wird. Der positive Nachweis des PR bedeutet also einen zusätzlichen prädiktiven Faktor für einen Therapieerfolg (Mohsin et al, 2004; 87). Seit der 9. Konsensus Konferenz von St. Gallen im Januar 2005 steht nicht mehr die Einteilung in Risikogruppen für die Auswahl der adjuvanten Therapie im Vordergrund, sondern die endokrine Sensibilität. Dies bedeutet, dass ER und PR obligat quantitative prädiktive Marker sind: Man unterscheidet derzeit im Bezug auf das Ansprechen auf eine endokrine Therapie die drei Kategorien endokrin sensibel, unbestimmt und nicht sensibel, in Abhängigkeit vom Ausmass der ER/PR Expression (Goldhirsch et al, 2005; 1).

2.3.2.2 DNA Amplifikation

Die Amplifikation des FGFR1 Genes auf 8p12 korreliert, insbesondere in Kombination mit amplifiziertem Cyclin D1 Gen, mit reduziertem krankheitsfreiem Überleben (Cuny M et al.; 82). Etwa 20% der Mammacarcinome weisen eine MYC-Amplifikation auf

8q24 auf, die verbunden ist mit einer fehlenden ER-Expression, lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum und schlechter Prognose (Berns EM et al.; 2). Cyclin D1 auf 11q13 ist in 15-20%, häufiger bei lobulären als ductalen Carcinomen, amplifiziert und bei ER-positiven Carcinomen mit einer relativ schlechten Prognose assoziiert (Cuny M et al.; 82, Schuurung et al.; 88). Kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass eine Amplifikation des TOP2A Genes auf 17q21 signifikant mit einem verbesserten Überleben unter Anthracyclin-Chemotherapie assoziiert ist (Knoop et al, 2005; 3).

2.3.2.3 Gen Expressions Profile

Die Methode des Genexpressions Profiling mit DNA Microarrays hat zu einer molekularen Klassifikation der Mammacarcinome geführt. So lassen sich derzeit fünf intrinsische Subtypen in Analogie zu den Ausgangszellen des normalen Brustdrüsengewebes unterscheiden (Tab.2.1).

Subtyp	Rezeptorstatus	HER2-Status
Luminal A	Stark ER+	negativ
Luminal B	Schwach ER+	Negativ
Basal-like	ER-/PR-	Negativ
HER2 überexprimiert	ER/PR variabel-	Positiv
Normal-breast-like		Negativ

Tabelle 2. Molekulare Klassifikation der Mammakarzinome

Der Basal-like und der HER2+ Subtyp, insbesondere der HER2+ ER- Typ, sind mit den schlechtesten Überlebensraten verbunden. In der Gruppe der ER+ Carcinome bestehen Unterschiede hinsichtlich des Überlebens. So zeigt die Luminal B Subgruppe eine schlechtere Prognose (Sorlie et al 2001; 4 & 2003; 77, Cheng et al. 2006; ,Van de Vijver et al.2002; 29, Van't Veer et al. 2002; 28). Paik et al. konnten mittels eines RT-PCR Assays aus 21 prospektiv selektierten Genen an paraffin-eingebettetem Tumorgewebe einen validierten Score zur Rezidiv-Vorhersage entwickeln (Paik et al.; 78).

3 Ziele der Dissertation

Die Bedeutung einer Überexpression des Proteinproduktes des HER2-neu Genes als ungünstiger Prognosefaktor einerseits und prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®) andererseits ist in zahlreichen Studien nachgewiesen worden. Zugrunde liegt in den meisten Fällen eine Amplifikation des auf dem Chromosom 17 in der Region 17q21 lokalisierten HER2-neu Gens. Ein zweiter Mechanismus zur Vervielfältigung der Gen-Kopien ist eine Polysomie des Chromosoms 17.

Ebenfalls auf Chromosom 17 befindet sich das TP53 Gen, das häufig mutiert ist. Die Überexpression des mutierten p53 Proteins korreliert mit einer schlechteren Prognose und Resistenz gegen Anthracycline (Rahko et al, 2002; 13).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen einer Überexpression des HER2-neu Proteins und einer Polysomie des Chromosoms 17 nachweisbar ist und wie häufig dies der Fall ist. Gleichzeitig wurde untersucht, ob eine Beziehung zwischen einer Expression von p53 Protein und einer Polysomie des Chromosoms 17 nachweisbar ist.

Weiterhin wurde untersucht, ob Korrelationen zwischen einer Chromosom 17-Polysomie und anderen Prognosefaktoren sowie prädiktiven Faktoren erkennbar sind. Berücksichtigt wurden die Tumorgrösse, der Nodalstatus, der histologische Typ, der Differenzierungsgrad, der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie das Alter der Patienten.

4 Material Methoden

4.1 Untersuchungsmaterial und darauf bezogene Patientendaten

Gegenstand der Untersuchung waren insgesamt 104 invasive Mammacarcinome. Sämtliche Untersuchungen wurden an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus dem laufenden Eingangsmaterial des Jahres 2005 der Institute für Pathologie in Remscheid und Wilhelmshaven durchgeführt. Differenziert nach der routinemäßig immunhistochemisch ermittelten HER2-neu Überexpression wurden 48 HER2-neu dreifach (3+) und 54 zweifach (2+) überexprimierte Fälle analysiert. Der immunhistochemische Nachweis einer p53 Expression wurde nachträglich an Archivmaterial geführt. Von insgesamt 17 der CEP17 polysomen Fälle war Blockmaterial verfügbar. Als Kontrollgruppe dienten 12 eusome Fälle aus dem Kollektiv.

Es handelte sich ausschließlich um weibliche Patienten. Das Alter lag durchschnittlich bei etwas über 60 Jahren mit einer Verteilung zwischen 29 und 91 Jahren. Es wurden Daten über die Tumorgroße bzw. das T-Stadium, den Nodalstatus, Fernmetastasen, Grad, histologischen Typ sowie den Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status erhoben (Tabelle 4.1).

	HER2-neu 3+	HER2-neu 2+
Histologischer Typ	Anzahl	Anzahl
Invasiv ductal	38	41
Invasiv lobulär	3	5
Invasiv tubulo-lobulär	1	1
Invasiv tubulär	2	0
Invasiv papillär	0	1
Nicht ermittelt*	7	6

	HER2-neu 3+	HER2-neu 2+
Tumorgröße	Anzahl	Anzahl
T1	25	14
T2	8	18
T3	4	4
T4	3	2
Nicht ermittelt	0	16
Nodalstatus	Anzahl	Anzahl
N0	18	23
N1	13	10
N2	3	1
N3	4	3
Nicht ermittelt	12	17
Differenzierungsgrad	Anzahl	Anzahl
G1	2	0
G2	30	29
G3	13	16
Nicht ermittelt*	5	9

	HER2-neu 3+	HER2-neu 2+
Östrogenrezeptor +	33	33
Östrogenrezeptor -	14	14
Progesteronrezeptor+	29	30
Progesteronrezeptor -	18	17
Nicht ermittelt	3	7

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der Daten. *Im primären pathologisch-anatomischen Befund nicht bestimmt, kein Material zur Reevaluierung verfügbar

4.1.1 Klassifikation und Einteilung der Mammacarcinome

Die histologische Klassifikation erfolgte nach den Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation von 2004 (Tavassoli FA, Devilee P (Eds.); 25). Das Grading wurde nach Elston & Ellis 1991 durchgeführt (14). Die Einteilung erfolgte nach der aktuellen TNM – Klassifikation der UICC (UICCTNM Classification of Malignant Tumours Sobin LH, Wittekind Ch(Editors), 6th edition 2002; 23).

4.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis einer HER2-neu Überexpression wurden routinemässig von allen Fällen durchgeführt. Der p53 Nachweis wurde nachträglich an Archivmaterial durchgeführt. Von 17 der CEP17 polysomen Fälle war Blockmaterial verfügbar. Als Kontrollgruppe dienten 12 eusome Kontrollfälle aus dem Kollektiv.

4.2.1 Herstellung und Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die in 4,5%igem, neutral gepuffertem Formalin fixierten Gewebeproben wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70-100%) entwässert danach mittels Xylol vom Alkohol befreit und anschließend in maximal 60°C warmes Paraffin eingebettet. Danach wurden 3µ dicke Schnittpräparate auf beschichteten Objektträgern hergestellt. Nach Trocknen im Wärmeschrank über Nacht bei 37-40°C, wurden die

Schnittpräparate in reinem Xylol für ca.20 min., entparaffiniert und anschliessend in absteigender Alkoholreihe (100%-79%) rehydriert. Abschliessend wurden sie 30 sec in Aqua dest. gespült. Die Formalinfixierung ruft eine Veränderung der Struktur der Proteine hervor. Dadurch kommt es auch zu einer Veränderung der antigenen Bindungsstellen, den Epitopen. Man spricht von einer „Antigen-Maskierung“. Um die Immunreaktivität der Epitope wiederherzustellen, also eine „Antigen-Demaskierung“ herbeizuführen, eignet sich besonders die auch hier eingesetzte Methode der Hitzeinduzierten Epitop Wiederherstellung (Retrieval), kurz HIER, durch Erhitzen bis nahe des Siedepunktes von Wasser (90-95 °C) in einer Pufferlösung, deren pH-Wert je nach Epitop zu wählen ist.

Hitzeinduzierte Antigendemaskierung: Im Dampfgerar (Braun MultiGourmet TYP FS20) 30 min bei 100,4°C in Target-Retrieval-Lösung (Dakocytomation). 20 min Trocknen bei Raumtemperatur.

4.2.2 Nachweis der Antigene

4.2.2.1 Allgemeine Methode der immunhistochemischen Färbung

Zugrunde liegt das Prinzip der Antigen-Antikörper Reaktion.

Die Bindung des Primärantikörpers an die Epitope in der Gewebeprobe wird mit einem Detektionssystem nachgewiesen und sichtbar gemacht. Zugrunde liegt die markierte (Strept)Avidin-Biotin-Komplex-Methode (LSAB, Labeled StreptAvidin Biotin), bei der zuerst der Primärantikörper an das Epitop bindet. Es folgt in einem zweiten Schritt die Reaktion zwischen einem biotinyliertem Sekundärantikörper und dem Primärantikörper, der hierbei seinerseits als Antigen fungiert. Im dritten Schritt reagiert dieser Komplex mit einem Enzym-gekoppelten Streptavidin. Abschliessend erfolgt die Visualisierung des Komplexes durch den Einsatz einer Substrat-Chromogenlösung (AES oder DAB).

Die Bindung des Primärantikörpers an die Gewebeprobe wird mit dem Detektionssystem ChemMate® FastRed, Rabbit/Mouse/Alkaline Phosphatase (K5005 Dakocytomation, Denmark) nachgewiesen und sichtbar gemacht.

Das System ist zur Detektion von Maus- und Kaninchen-Antikörpern (mono- und polyklonal) auf dem Färbeautomaten AutostainerPlus® (Dakocytomation) geeignet. Das Detektionssystem besteht aus einem biotinylierten Sekundärantikörper gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline, einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Streptavidin und dem Chromogen Neufuchsin.

Alle Schritte werden automatisiert durchgeführt.

4.2.3 Prinzip des HercepTest®- Verfahrens und Charakterisierung des Antikörpers HER2-neu

Der HercepTest® stellt ein zwei Schritte umfassendes immunhistochemisches Färbeverfahren dar. Im ersten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das humane HER 2 Protein, einem gebrauchsfertigen affinitätsisolierten Kaninchen-Antikörper, der gegen den intrazytoplasmatischen Abschnitt des C-terminalen Fragmentes des HER2-Proteins gerichtet ist. In einem zweiten Schritt wird ein Visualisierungsreagenz, das auf der Dextran-Technologie beruht, eingesetzt. Hierbei sind Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulinmoleküle des sekundären Antikörpers über eine Dextranpolymerkette mit Meerrettichperoxidase-Molekülen verknüpft. Durch diese Methode entfällt die sonst übliche sequentielle Anwendung des sekundären „Link“-Antikörpers und des Peroxidase-konjugierten Antikörpers. Abschliessend wird durch die enzymatische Umwandlung des Chromogens DAB das lichtmikroskopisch sichtbare finale Reaktionsprodukt erzeugt. Zur Validierung der Reaktionsschritte wird ein Kontrollobjektträger des HercepTest®-Kits mit Mammakarzinomzelllinien identisch prozessiert wie die zu analysierenden Schnittpräparate.

4.2.3.1 Immunhistochemische Färbemethode zum Nachweis der Proteinprodukte des HER2-neu Gens

Für die immunhistologische Markierung wurde das Hercep Test-Kit (K 5204, DakoCytomation GmbH) verwandt. Die Waschvorgänge in Puffer und Aqua dest. wurden in Küvetten jeweils mit 50 ml Flüssigkeit durchgeführt. Die Retrievalanwendung wurde in einer Küvette mit 100 ml Lösung durchgeführt. Der Waschpuffer (Tris-HCl) (Flasche Nr. 8) wurde in einer Konzentration von 1:10 und einer Verbrauchsmenge von 500 ml angesetzt (50 ml Puffer + 450 ml Aqua dest.). Alle Inkubationen und Waschvorgänge wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Durchführung der Immunhistologie mit dem HercepTest® umfasst die unten aufgeführten Arbeitsschritte, die im AutostainerPlus® automatisiert durchgeführt wurden. Pro Färbedurchgang wurde ein Kontrollobjektträger mit Mammacarcinomzelllinien (Bestandteil des HercepTest® Kits) identisch prozessiert. Ausserdem wurde für jeden zu testenden Fall eine Negativkontrolle mitgeführt.

Nach Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe verblieben die Schnitte 30 sec in Aqua dest.

Arbeitsschritte

Schnitte in Retrieval Lösung (Flasche Nr. 7) 1:10 (10 ml Retrieval Lösung + 90 ml Aqua dest) im Wasserbad bei 98°C für 40 min inkubieren, wie unter 4.2.1 beschrieben. 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Die folgenden Schritte werden in einer feuchten Kammer durchgeführt:

Waschpuffer 5 min

3 Tropfen des Peroxidase-Blockierungsreagenz (Flasche Nr. 1) pro Schnitt auftropfen, 5 min inkubieren

Aqua dest. 1 min

Waschpuffer 5 min

3 Tropfen des Primäantikörpers (Kaninchen Anti-Human HER2 Protein) (Flasche Nr. 2) pro Schnitt auftropfen und 30 min inkubieren.

Frischer Waschpuffer 1 min

Frischer Waschpuffer 5 min

3 Tropfen der Visualisierungslösung (enzymgekoppelter sekundärer Antikörper) (Flasche Nr. 3) pro Schnitt auftropfen und 30 min inkubieren

Frischer Waschpuffer 1 min

Frischer Waschpuffer 10 min

1 Tropfen des DAB Chromogens (Flasche Nr. 6) auf 1 ml mit DAB Puffer-Substrat (Flasche Nr. 5) auffüllen (hierzu werden 5 ml Plastikmessgefäße aus dem LSAB2-Kit von Dakocytomation benutzt). Pro Schnitt 100 µl des Gemisches auftropfen und 10 min inkubieren.

Aqua dest. 5 min

Hämalaun 2 min

Leitungswasser 5 min

Eindecken in Faramount (Dako)

Durchführung automatisiert im Autostainer Plus® (Dakocytomation):

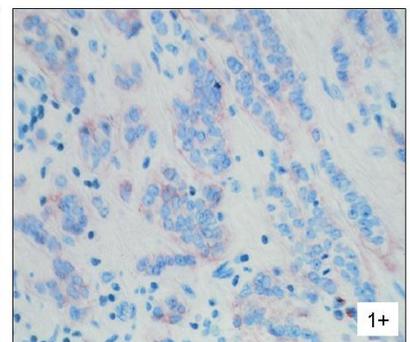
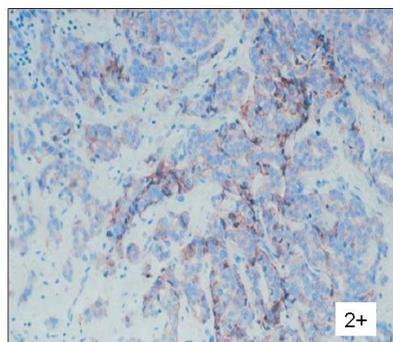
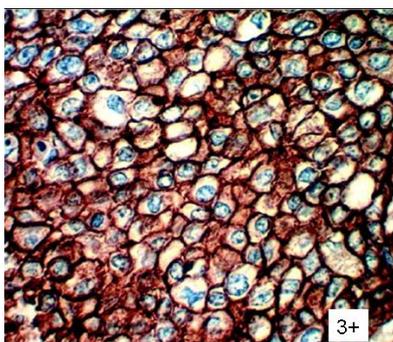
Peroxidase-Blockierung, Inkubation mit Primäantikörper Kaninchen Anti-Her-2/neu (vorverdünnt) für 30 min, Inkubation mit enzymgekoppelten Sekundäantikörper für 30 min, Inkubation mit Chromogen (DAB) für 2X5 min und alle zwischengeschalteten Waschvorgänge

Fertigstellung (manuell): Hämalaun 30 sec, Leitungswasser 5-10 min, Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol (rein), Eindecken mit Histofluid®

4.2.3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung erfolgt nach dem DAKO Scoring System, das unten tabellarisch aufgeführt ist.

Färbemuster	Score	Status der HER2/neu Überexpression
Keine Anfärbung oder Membranfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen	0	Negativ
Schwache, kaum wahrnehmbare Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen. Die Zellmembran nur partiell gefärbt	1+	Negativ
Schwache bis mässig starke Anfärbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen	2+	Überexpression muss durch FISH-Analyse abgeklärt werden
Starke Anfärbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen	3+	Positiv



4.2.4 Charakterisierung des Antikörpers p53 zur immunhistochemischen Färbung

Zum Nachweis der Proteinprodukte des p53 Gens wurde ein monoklonales Maus-Anti-Human p53 Protein, DO-7 (Dakocytomation, Denmark) in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Der Klon DO-7 bindet spezifisch an ein Epitop, das innerhalb der Aminosäuren 35-45 des N-Terminus der Wild-und Mutantentypen des p53-Proteins lokalisiert ist.

4.2.4.1 Immunhistochemische Färbemethode zum Nachweis der Proteinprodukte des p53 Gens

Die nach der unter 3.2.1 beschriebenen Methode angefertigten und vorbehandelten Gewebsschnitte wurden mit dem ChemMate® Detection Kit Alakaline Phosphatase/RED/Rabitt/Mouse der Fa Dakocytomation (Denmark) im AutostainerPlus® (Dakocytomation) immunhistochemisch gefärbt. Für jeden Färbedurchgang wurde eine Positivkontrolle mitgeführt (Tonsille).

Blockierung der endogenen Peroxidase durch Wasserstoffperoxid für 5min

30 min. Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-p53 DO-7, Verdünnung 1:200

Spülen mit TBS (S3006, Dakocytomation)

15 min. Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (aus DAKO K5005)

Waschschritt mit TBS (S3006,Dakocytomation).

15 min. Inkubation mit dem Alkalische-Phosphatase-konjugierten Streptavidin (aus DAKO K5005)

Spülen mit TBS (S3006, Dakocytomation)

Die Schnitte werden dann 2 x 7 min. mit dem Neufuchsin-Farbstoff (aus DAKO K5005) inkubiert, zwischen den Chromogensritten werden die Schnitte mit TBS (S3006, Dakocytomation) und nach der Chromogen-Inkubation mit Aqua dest gewaschen.

Die abschliessenden Schritte erfolgen manuell.

Hämalaun 2 min, Leitungswasser 5-10 min, Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70-100%), 4 mal Xylol (rein), Eindecken mit Histofluid®

4.2.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die gefärbten histologischen Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Als positiv galten Zellen, deren Zellkerne eindeutig rot angefärbt waren. Unterschiede in der Färbintensität wurden nicht berücksichtigt. Ausgewählt wurden Bereiche mit eindeutig invasiven Carcinominfiltraten. Der Anteil der positiven Zellen wurde in Prozent angegeben.

4.3 FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)

4.3.1 Grundlagen der Methode

Bei dieser Methode wird eine fluoreszenz-markierte Sonde bekannter DNS mit denaturierter DNS aus Metaphase- und Interphase- Chromosomen in formalinfixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebsschnitten auf Objektträgern hybridisiert. Die Signale können dann fluoreszenzmikroskopisch optisch ausgewertet werden.

4.3.2 Vorbereitung

Die in 4,5%igem, neutral gepuffertem Formalin fixierten Gewebeproben wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70-100%) entwässert, danach mittels Xylol vom Alkohol befreit, gefolgt von Infiltration durch maximal 60°C warmes Paraffin. Danach wurden 4µ dicke Schnittpräparate hergestellt und auf speziell beschichtete Objektträger aufgezogen. Trocknen im Wärmeschrank über Nacht bei 37-40°C.

4.3.3 Durchführung

Die FISH-Analyse wurde mit dem PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit (Abbott Laboratories) durchgeführt. Das Kit liefert eine Mischung von zwei DNA FISH Sonden, LSI®HER-2 SpectrumOrange® zum Nachweis des HER2 Gens und CEP®17 SpectrumGreen® zur Darstellung der Centromer-Region des Chromosoms 17 in Hybridisierungs-Puffer.

4.3.3.1 Entparaffinieren und Rehydrieren

Objektträger für 10 min in Xylol inkubieren, zwei mal wiederholen und jeweils Bäder wechseln

5 min in 100% Alkohol, einmal wiederholen und Bad wechseln

Trocknen an der Luft oder auf 2-5 min auf einer 45-50°C warmen Heizplatte

4.3.3.2 Vorbehandlung 1.Tag

Objektträger 20 min in 0,2 N HCL tauchen

3 min Aqua dest

3 min SSC Waschpuffer

Objektträger 30 min in auf 80°C erhitzter (Temperatur mit kalibriertem Thermometer überprüfen!) Pretreatment-Lösung inkubieren

1 min Aqua dest

5 min SSC Waschpuffer, Puffer wechseln

5 min SSC Waschpuffer

4.3.3.3 Enzymatische Verdauung mit Protease

Da das Proteasepulver bei -20°C gelagert wird und die Reaktion bei 37°C erfolgt, muss die Enzymlösung vorab angesetzt werden. Hierzu werden 10 mg Proteasepulver in 20 ml auf 37°C erwärmte Pufferlösung gelöst.

Die Objektträger 10 min bei 37°C (Temperaturkontrolle) mit der Proteaselösung inkubieren

5 min SSC Waschpuffer, Puffer wechseln

5 min SSC Waschpuffer

10 min 4% Formalin zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion

5 min SSC Waschpuffer, Puffer wechseln

5 min SSC Waschpuffer

Trocknen an der Luft oder 2-5 min auf einer 45-50°C warmen Heizplatte

4.3.3.4 Denaturierung und Hybridisierung

4-8 µl der HER2/CEN-17 Sonden-Mischung auf den Objektträger aufbringen, so dass die Gewebeprobe vollkommen bedeckt ist. Sofort 22mm x 22mm Deckglas auflegen, ohne dass Luftblasen entstehen, und mit Fixogum versiegeln.

Automatischer Vorgang im DakoCytomation Hybridizer nach voreingestelltem Protokoll:

5 min Denaturierung bei 82°C und Hybridisierung über Nacht (18-24 Std.) bei 45°C

Feuchtigkeitsstreifen einlegen und Hybridizer mit den Objektträgern bestücken, Protokoll (04 FISHWA) starten.

4.3.3.5 Stringentes Waschen in Post-Hybridisierungs-Puffer, Tag 2

Nach Entnahme der Objektträger aus dem Hybridizer in 2xSSC Puffer geben, um Gummierung zu entfernen, Deckglas ablösen

2 min im ersten Waschbad aus 2xSSC/0,3%NP-40, auf 72°C im Wasserbad erhitzt, spülen

1min im zweiten Wasserbad aus 2xSSC/0,3%NP-40 bei Raumtemperatur spülen

Kurz in Aqua dest. abspülen und im Dunkeln lufttrocknen

Kernfärbung mit 10 µl DAPI (Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid)

Mit Deckglas einschliessen

Zur Verhinderung des Ausbleichens bei 2°C-8°C lichtgeschützt aufbewahren

4.3.4 Auswertung

Die Auswertung kann 15 min nach Fertigstellung bis 7 Tage danach erfolgen.

Die Hybridisierungssignale wurden an einem Epifluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

Das Mikroskop ist ausgestattet mit einer 100W Quecksilberdampfampe und folgenden Filtern:

1. Blaufilter (Aquafilter) single bandpass
2. Rot/Grün-dual bandpass filter
3. Rotfilter-single bandpass
4. Gelbfilter-single bandpass

Für die Auswertung wurden Bereiche mit eindeutig invasivem Carcinom gewählt, die eine gute Verteilung der Zellkerne aufwiesen. Es wurden mehrere Bereiche untersucht, um eine mögliche Heterogenität zu berücksichtigen. Als interne Qualitätskontrolle dienten normale Zellkerne, die 1-2 deutlich erkennbare grüne Signale als Hinweis dafür, dass die Sonde erfolgreich an die Centromer-Region von Chromosom 17 angelagert hat und 1-2 deutliche rote Signale als Beweis einer Sondenanlagerung an das HER2-Amplicon, aufweisen müssen.

Von den ausgewählten Tumorbereichen wurden dann die roten und grünen Signale von 20 Zellkernen ausgezählt.

Hierbei wurde folgendes berücksichtigt:

Wenn zwei Signale, die die gleiche Grösse aufweisen und nur durch eine Distanz getrennt sind, die kleiner oder gleich der Signalgrösse ist, werden diese als nur ein Signal gezählt.

Bei hoher Amplifikation des HER2-Gens können die roten Signale sehr nahe aneinander liegen und einen Cluster bilden. In diesen Fällen erfolgt eine Schätzung der Signal-Anzahl. Besonders zu beachten ist, dass diese Cluster die grünen Signale überlagern können.

Nach Auszählen der Signale wurde das HER2/CEN17-Verhältnis durch Division der Gesamtzahl der roten HER2- und der grünen CEN17-Signale ermittelt.

Bei einem HER2/CEN17-Quotienten von 2 oder grösser, ist eine Amplifikation des HER2-Gens anzunehmen. Lag der Quotient im grenzwertigen Bereich (1,8-2,2), wurden 20 weitere Kerne ausgezählt und das Verhältnis auf der Basis von 40 Nuclei neu berechnet.

Für den Nachweis einer Polysomie von Chromosom 17 wurde der Quotient aus der Anzahl der grünen Signale und der ausgezählten Kerne ermittelt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass auch ein vorherrschend eusomer Tumor mehr als 2 Signale pro Kern aufweisen kann, bedingt durch hohe Mitoserate, genetische Instabilität oder schnittbedingte Zerteilung der Kerne, galten Fälle mit einem Quotienten grösser 2.15 als polysom.

4.4 Statistik

4.4.1 Datenverarbeitung und Dokumentation

Die statistische Verarbeitung der erhobenen Daten sowie die graphische und tabellarische Darstellung erfolgte mit dem Programm SPSS 11.5 sowie alternativ mit SAS Version 8.

4.4.2 Überblick über die verwendeten Verfahren

Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurden – je nach Fragestellung - die folgenden Kennwerte angegeben:

Bei Häufigkeitsdaten die absolute und relative Häufigkeit (% Werte).

Bei metrischen Daten das arithmetische Mittel, als Maß für Variabilität die Standardabweichung, das Minimum und Maximum, die Fallzahl, sowie die Perzentile. Perzentile, zu denen auch der Median zählt, können als „Eckpunkte“ einer

Werteverteilung bezeichnet werden. Beispielsweise charakterisiert der median den Wert, der die Stichprobe in der Mitte teilt.

4.4.3 Überblick über die verwendeten Testverfahren zur Bestimmung der Statistischen Signifikanz und kurze Erläuterung der Zielsetzung

Die Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die verwendeten statistischen Rechenverfahren. Ohne Ausnahme werden alle statistischen Tests rein explorativ eingesetzt. Insofern haben alle Befunde keinen „beweisenden“ oder „konfirmativen“ Charakter.

Tabelle 4.2: Überblick über die explorativ verwendeten statistischen Verfahren

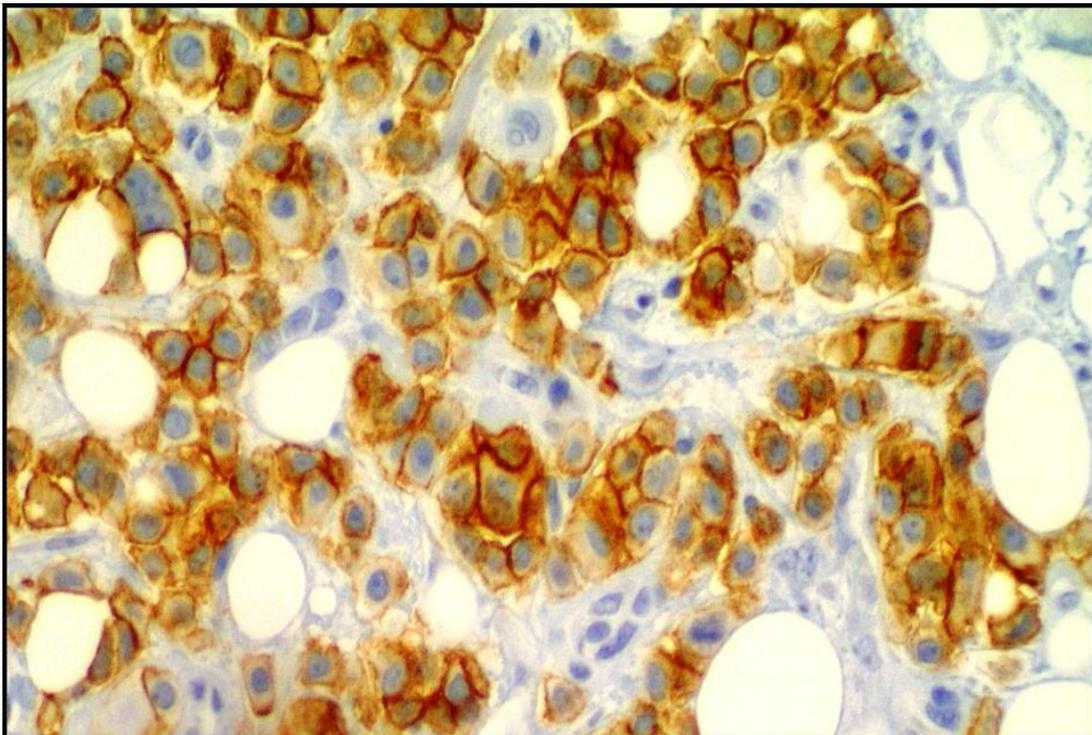
Test	Zielsetzung
Mann-Whitney-U-Test (Sachs, 1992)	Vergleich und Bewertung von Unterschieden zweier Gruppen in Parametern, die stetige Daten enthalten
Chi ² -Test, Fisher-Yates-Test (Bortz, 1990)	Prüfung von Unterschieden bei Häufigkeitsdaten (z.B. Prüfung, ob Unterschiede in Prozentwerten bestehen)
Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis (Lehmann, 1998)	Unterschiedsprüfung ohne Rückgriff auf klassische Voraussetzungen wie Normalverteilung und Varianzhomogenität der Rohdaten.

5 Ergebnisse

5.1 Chromosom 17 Polysomie bei HER2-neu Überexpression

Von den 104 in der FISH-Analyse untersuchten Fällen lies sich bei 24 (23%) eine Polysomie des Chromosoms 17 nachweisen. Darunter wiesen 6 (25%) immunhistochemisch einen HER2-neu 2+ und 18 (65%) einen HER2-neu 3+ Score auf.

Abbildung 5.1 Immunhistochemischer Nachweis einer HER2-neu Überexpression



5.2 Unterschiede zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen im Bezug auf die prognostischen Parameter und p53 Expression

Die Patienten waren im Durchschnitt etwas über 60 Jahre alt (im Durchschnitt 63 Jahre \pm 14 bei CEP17 nicht polysomen und 63 Jahre \pm 13 in der Gruppe der CEP17 polysomen Fälle, Tabelle 5.1)

Altersunterschiede zwischen den beiden Gruppen waren statistisch nicht bedeutsam ($p=0.83$, Mann-Whitney-Test, Bortz, 1992, zweiseitig). Auch die p53-Werte zeigten

(sicherlich fallzahlbedingt) keine bedeutsamen Unterschiede ($p=0.31$, zweiseitiger Mann-Whitney-Test, Bortz, 1992). Zwar unterscheiden sich die Mittelwerte (28% vs. 43% bei Carcinomen mit CEP17 Polysomie) deutlich. Allerdings erreichte dieser Befund fallzahlbedingt (nur 13 bzw. 17 Werte verfügbar) und bedingt durch die großen Variabilitäten (siehe die Standardabweichungen von 33 bzw. 37%) keine statistische Bedeutsamkeit.

Tabelle 5.1 Deskriptive Statistiken zum Altersunterschied zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen

	nicht polysom n = 80							polysom n = 24							Deskriptiver Test		
	m	sd	min	25.p	med.	75.p	max	n	m	sd	min	25.p	med.	75.p		max	n
Alter in Jahren	63	± 14	(29	52	64	70.5	91)	72	63	± 13	(35	53	63	73	84)	24	p=0.83
p53 Immunhisto in %	28	± 33	(1	5	10	30	90)	13	43	± 37	(0	10	30	90	90)	17	p=0.31

Datenbasis: n=104. Werte nicht verfügbar: Alter in Jahren n=8, p53 Immunhisto in % n=74

Schlussfolgernd fanden sich keine statistisch bedeutsamen Unterschiede bezüglich des Alters und der p53-Expression zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen.

Ein Blick auf die Positivfrequenzen im Östrogenrezeptor-Status (Tabelle 5.2) zeigte jedoch, dass CEP17 polysome Carcinome wesentlich seltener positiv waren (52%) als nicht polysome Carcinome (76%, $p=0.04$, zweiseitiger Fisher-Test). Keine Unterschiede fanden sich im Progesteronrezeptorstatus ($p=0.14$, zweiseitiger Fisher-Test) und in der Tumorgröße ($p=1.000$, exakter Chi²-Test). Auch im Nodal-Status ($p=0.425$, exakter Chi²-Test) oder im histologischen Typ ($p=1.000$, exakter Chi²-Test) ließen sich keine Unterschiede aufzeigen. Signifikante Unterschiede fanden sich hingegen im Differenzierungsgrad ($p=0.021$, exakter Chi²-Test), denn hier waren höhere Werte (Grad 3) bei Carcinomen mit CEP17Polysomie häufiger (55%),

während mittlere Differenzierungsgrade (Grad 2) bei nicht polysomen vorherrschten (73%).

Tabelle 5.2 Deskriptive Statistiken

		nicht polysom n = 80		polysom n = 24		Deskriptiver Test
Östrogenrezeptor-Status positiv	nein	17	24%	11	48%	p=0.04
	ja	54	76%	12	52%	
Progesteronrezeptor-Status positiv	nein	24	34%	12	52%	p=0.14
	ja	47	66%	11	48%	
Tumorgrosse T	1	31	50%	7	47%	p=1.000
	2	21	34%	5	33%	
	3	6	10%	2	13%	
	4	4	6%	1	7%	
Diff. Grad	1	1	1%	1	5%	p=0.021
	2	52	73%	9	41%	
	3	18	25%	12	55%	
N Status	0	32	53%	8	50%	p=0.425
	1	21	35%	4	25%	
	2	2	3%	2	13%	
	3	5	8%	2	13%	
Histologischer Typ	1	62	87%	20	91%	p=1.000
	2	5	7%	1	5%	
	3	1	1%	1	5%	
	4	1	1%	0	0%	
	5	2	3%	0	0%	

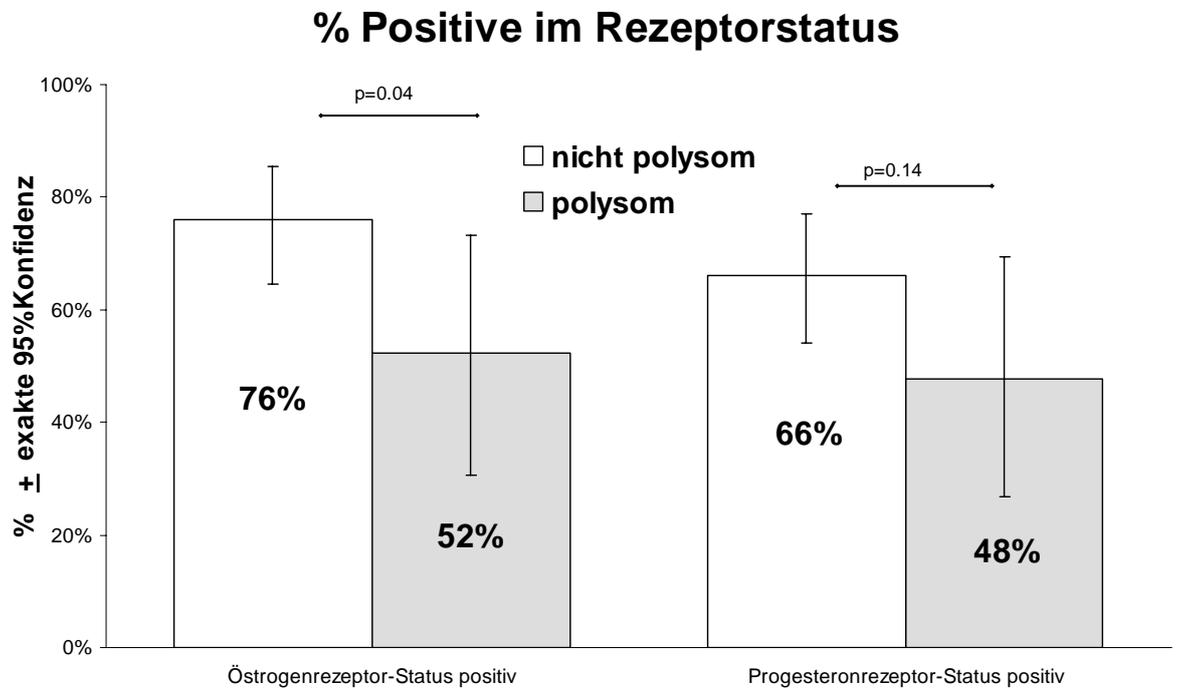
Datenbasis: n=104. Werte nicht verfügbar: Östrogenrezeptor-Status positiv n=10, Progesteronrezeptor-Status positiv n=10, Tumorgrosse T n=27, Diff. Grad n=11, N Status n=28, Histologischer Typ n=11.

Histologischer Typ 1=invasiv ductal, 2=invasiv lobulär, 3=tubulär, 4=papillär, 5=tubulo-lobulär

N Status 0=N0, 1=N1, 2=N2, 3=N3

Die nachfolgende Abbildung (5.1) zeigt die Unterschiede im Östrogenrezeptor-Status ($p=0.04$), während der Unterschied im Progesteronrezeptor-Status (sicherlich fallzahlbedingt) statistisch nicht bedeutsam war ($p=0.14$).

Abbildung 5.2 Unterschied im Östrogenrezeptor-Status und im Progesteronrezeptorstatus (zweiseitige Fisher-Tests, p-Werte < 0.05 weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin)



5.3 Unterschiede zwischen CEP17 polysomen und nicht polysomen Fällen im Bezug auf die prognostischen Parameter und p53 Expression unter Berücksichtigung der Amplifikation des HER2 Gens

Insgesamt waren nur 39% der eusomen Mammacarcinome für das HER2 Gen amplifiziert, während 71% der polysomen Carcinome amplifiziert waren (Tabelle 5.3). Dieser höhere Anteil der zuletzt genannten Gruppe war statistisch hochbedeutsam ($p=0.009$, Fisher-Test).

Tabelle 5.3 Zur Polysomie unter Berücksichtigung der Amplifikation

CEP17 Polysom	Her2 Amplifiziert	Datenbasis	%
nicht polysom	nicht amplifiziert	49	61%
	amplifiziert	31	39%
polysom	nicht amplifiziert	7	29%
	amplifiziert	17	71%

Datenbasis: n=104

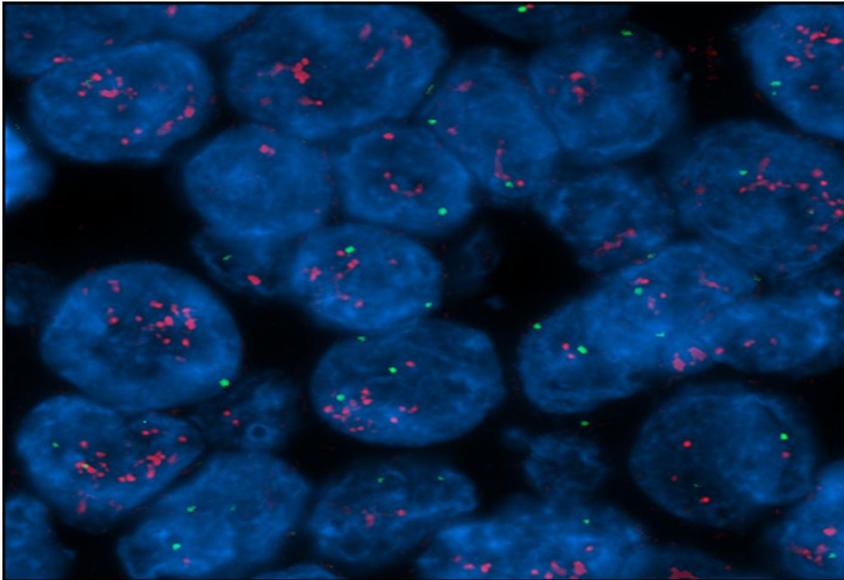


Abbildung 5.3 Amplifikation des HER2/neu Gens (rote Signale)

Als erster Parameter wurden Altersunterschiede zwischen den Gruppen geprüft. Die statistische Analytik mit Blick auf Alterswerte zeigte jedoch keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den 4 Gruppen der Tabelle (vergleiche auch die Altersmediane in Abbildung 5.).

Abbildung 5.4 Altersunterschiede je nach Polysomie und Amplifikation. Wichtigster Kennwert im Schaubild ist der Altersmedian. Die Altersmediane sind (unter Berücksichtigung der Fallzahl in Tabelle 5) nur vergleichsweise geringen Schwankungen unterworfen. Statistischer Test: Rangvarianzanalyse (Bortz, 1992).

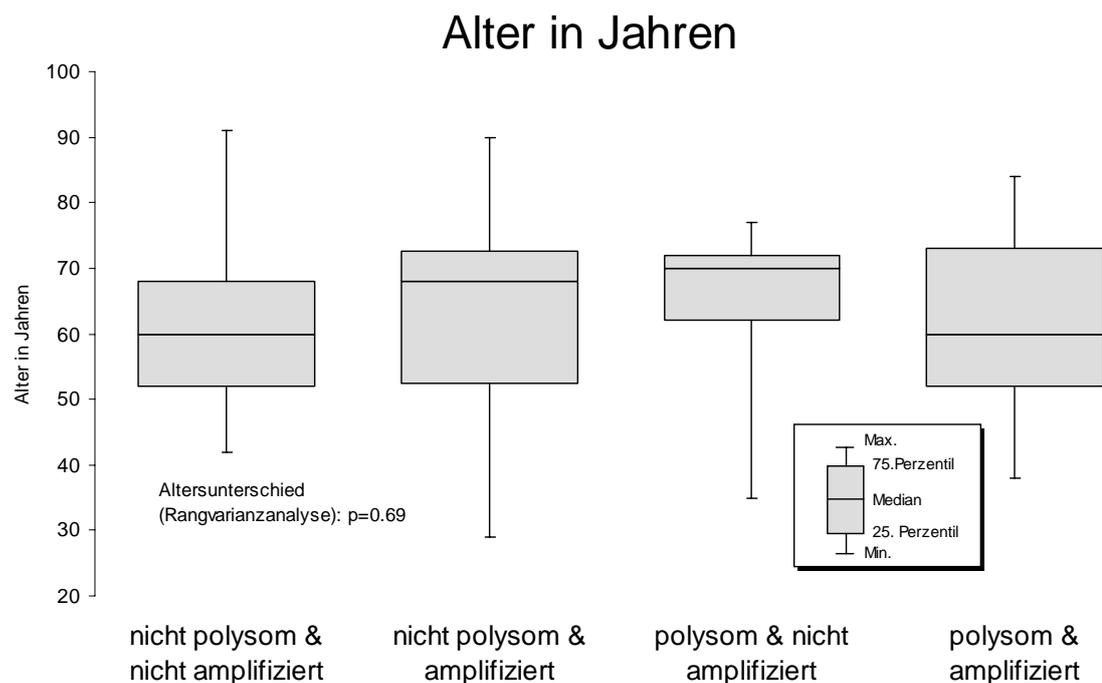


Tabelle 5.4 Deskriptive Statistiken

CEP17 Polysom & Her2 Amplifiziert	Alter in Jahren							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	median	75. Perzentil	Max.	
nicht polysom & nicht amplifiziert	62	14	42	52	60	68	91	45
nicht polysom & amplifiziert	64	15	29	53	68	73	90	27
polysom & nicht amplifiziert	64	14	35	62	70	72	77	7
polysom & amplifiziert	62	13	38	52	60	73	84	17
Gesamt	63	14	29	52	64	72	91	96

Datenbasis: n=104. Werte nicht verfügbar: Alter in Jahren n=8

Schlussfolgernd fand sich kein Zusammenhang zwischen Alter und CEP17 Polysomie, wenn man zusätzlich die Amplifikation des HER2-neu Gens berücksichtigt.

Die Werte für die p53 Expression (Abbildung 5.) sind jedoch deutlichen Schwankungen unterworfen. Insbesondere die Gruppe der CEP17 polysomen Carcinome ohne HER2-neu Gen-Amplifikation fällt durch erhöhte Wert auf (Tabelle 5.5). Bedingt durch die geringen Fallzahlen zeigte die Rangvarianzanalyse jedoch keinerlei statistisch bedeutsame Unterschiede ($p=0.22$).

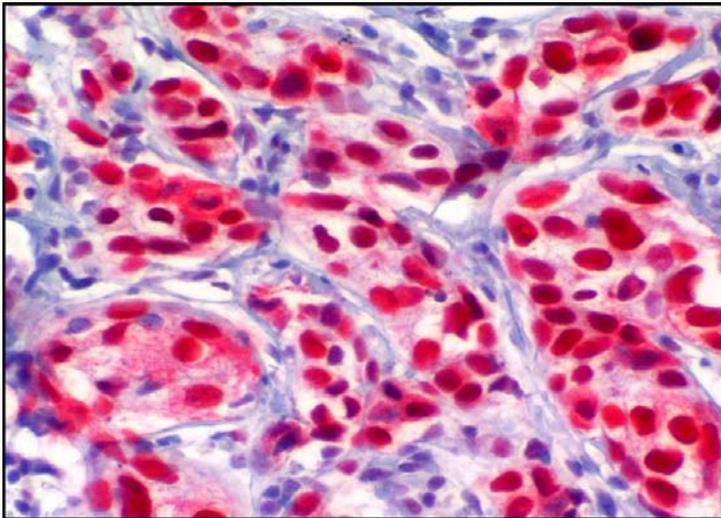


Abbildung 5.5 p53 Überexpression in einem invasiven ductalen Carcinom in mehr als 90% der Tumorzellkerne

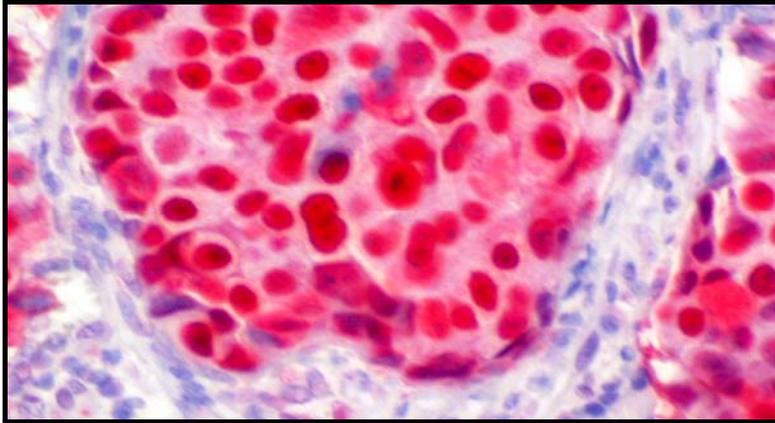


Abbildung 5.6 p53 Überexpression, gleicher Fall x40

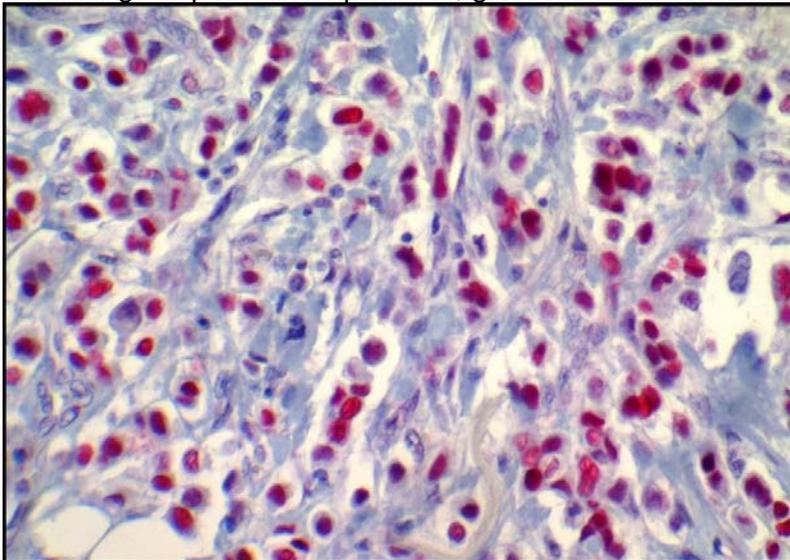


Abbildung 5.7 p53 Expression in einem invasiven lobulären Carcinom

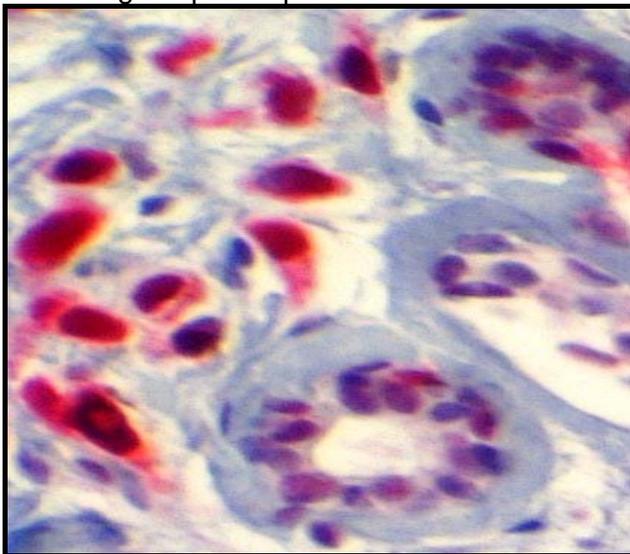


Abbildung 5.8 Gleicher Fall, Vergleich der p53 Expression zwischen Tumorzellkernen und Kernen des nicht neoplastischen Drüsenepithels

Abbildung 5.9 p53-Unterschiede je nach Polysomie und Amplifikation. Wichtigster Kennwert im Schaubild ist der Median. Die Mediane sind (unter Berücksichtigung der Fallzahl in Tabelle 5) grossen Schwankungen unterworfen. Statistischer Test: Rangvarianzanalyse (Bortz, 1992).

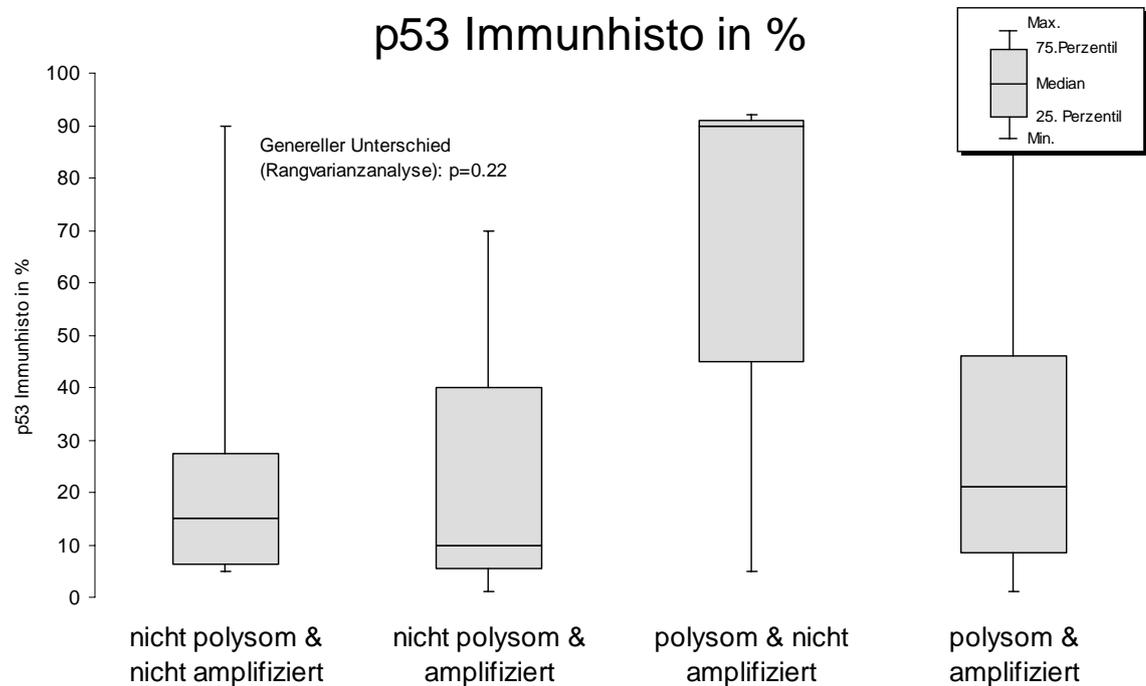


Tabelle 5.5 Deskriptive Statistiken zu den p53-Daten je nach Polysomie und Amplifikation

CEP17 Polysom & Her2 amplifiziert	p53 Immunhisto in %							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	median	75. Perzentil	Max.	
nicht polysom & nicht amplifiziert	29	33	5	6	15	28	90	10
nicht polysom & amplifiziert	27	38	1	6	10	40	70	3
polysom & nicht amplifiziert	66	38	5	45	90	90	90	6
polysom & amplifiziert	31	31	0	8	20	45	90	11
Gesamt	37	35	0	6	20	78	90	30

Datenbasis: n=104. Werte nicht verfügbar: p53 Immunhisto in % n=74.

Schlussfolgernd fand sich kein Zusammenhang von p53 Expression und der CEP17 Polysomie unter Berücksichtigung einer HER2 Gen Amplifikation. Sicherlich sind hier neben der geringen Fallzahl auch die auffallend grossen Variabilitäten ausschlaggebend (vergleiche die Standardabweichung in der zweiten Spalte der Tabelle 5.5), die ein positives statistisches Testergebnis verhindert haben.

Ein Blick auf die Positivfrequenzen im Östrogenrezeptor (Tabelle 5.6) zeigte keine statistisch bedeutsamen Unterschiede der vier Gruppen im Östrogenrezeptorstatus ($p=0.177$, exakter Chi²-Test) oder im Progesteronrezeptorstatus ($p=0.422$, exakter Chi²-Test). Auch in der Tumorgröße ($p=0.902$), im N-Status ($p=0.524$) und im histologischen Typ ($p=0.376$, alle Tests mittels exaktem Chi²-Test) ließen sich statistisch keine Unterschiede aufzeigen.

Unterschiede fanden sich jedoch im Differenzierungsgrad ($p=0.022$, exakter Chi²-Test), denn auch hier waren schlecht differenzierte Carcinome bei CEP17 Polysomie häufiger, während der mittlere Differenzierungsgrad bei nicht polysomen vorherrschte (Abbildung 5.6).

Tabelle 5.6 Deskriptive Statistiken zu den p53-Daten je nach Polysomie und Amplifikation. Statistische Tests: exakte Chi²-Tests (SPSS Prozedur „Crosstab“ und Option „method exact“, p-Werte < 0.05 weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied der 4 Gruppen hin

		nicht polysom & nicht amplifiziert n = 49		nicht polysom & amplifiziert n = 31		polysom & nicht amplifiziert n = 7		polysom & amplifiziert n = 17		Deskriptiver Test
Östrogenrezeptor-Status positiv	nein	10	24%	7	24%	3	43%	8	50%	p=0.177
	ja	32	76%	22	76%	4	57%	8	50%	
Progesteronrezeptor-Status positiv	nein	14	33%	10	34%	3	43%	9	56%	p=0.422
	ja	28	67%	19	66%	4	57%	7	44%	
Tumorgröße T	1	17	46%	14	56%	2	67%	5	42%	p=0.902
	2	14	38%	7	28%	0	0%	5	42%	
	3	4	11%	2	8%	1	33%	1	8%	
	4	2	5%	2	8%	0	0%	1	8%	
Diff. Grad	1	1	2%	0	0%	1	14%	0	0%	p=0.022
	2	28	67%	24	83%	2	29%	7	47%	
	3	13	31%	5	17%	4	57%	8	53%	
N Status	0	20	57%	12	48%	2	67%	6	46%	p=0.524
	1	12	34%	9	36%	0	0%	4	31%	
	2	1	3%	1	4%	1	33%	1	8%	
Histologischer Typ	3	2	6%	3	12%	0	0%	2	15%	p=0.376
	1	35	81%	27	96%	5	71%	15	100%	
	2	4	9%	1	4%	1	14%	0	0%	
	3	1	2%	0	0%	1	14%	0	0%	
	4	1	2%	0	0%	0	0%	0	0%	
	5	2	5%	0	0%	0	0%	0	0%	

Datenbasis: n=104. Werte nicht verfügbar: Östrogenrezeptor-Status positiv n=10, Progesteronrezeptor-Status positiv n=10, Tumorgröße T n=27, Diff. Grad n=11, N Status n=28, Histologischer Typ n=11.

Histologischer Typ 1=invasiv ductal, 2=invasiv lobulär, 3=tubulär, 4=papillär, 5=tubulo-lobulär N Status 0=N0, 1=N1, 2=N2, 3=N3

Auch wenn man explorative Einzeltests durchführt, wie es die nachfolgende Abbildung 5.10 zeigt, so fanden sich im wesentlichen keine statistisch bedeutsamen Unterschiede (d.h. oben genannte generelle Effekte ließen sich nicht auf bestimmte

Gruppenkontraste „lokalisieren“), was sicherlich auf die Fallzahlen zurückzuführen sein dürfte.

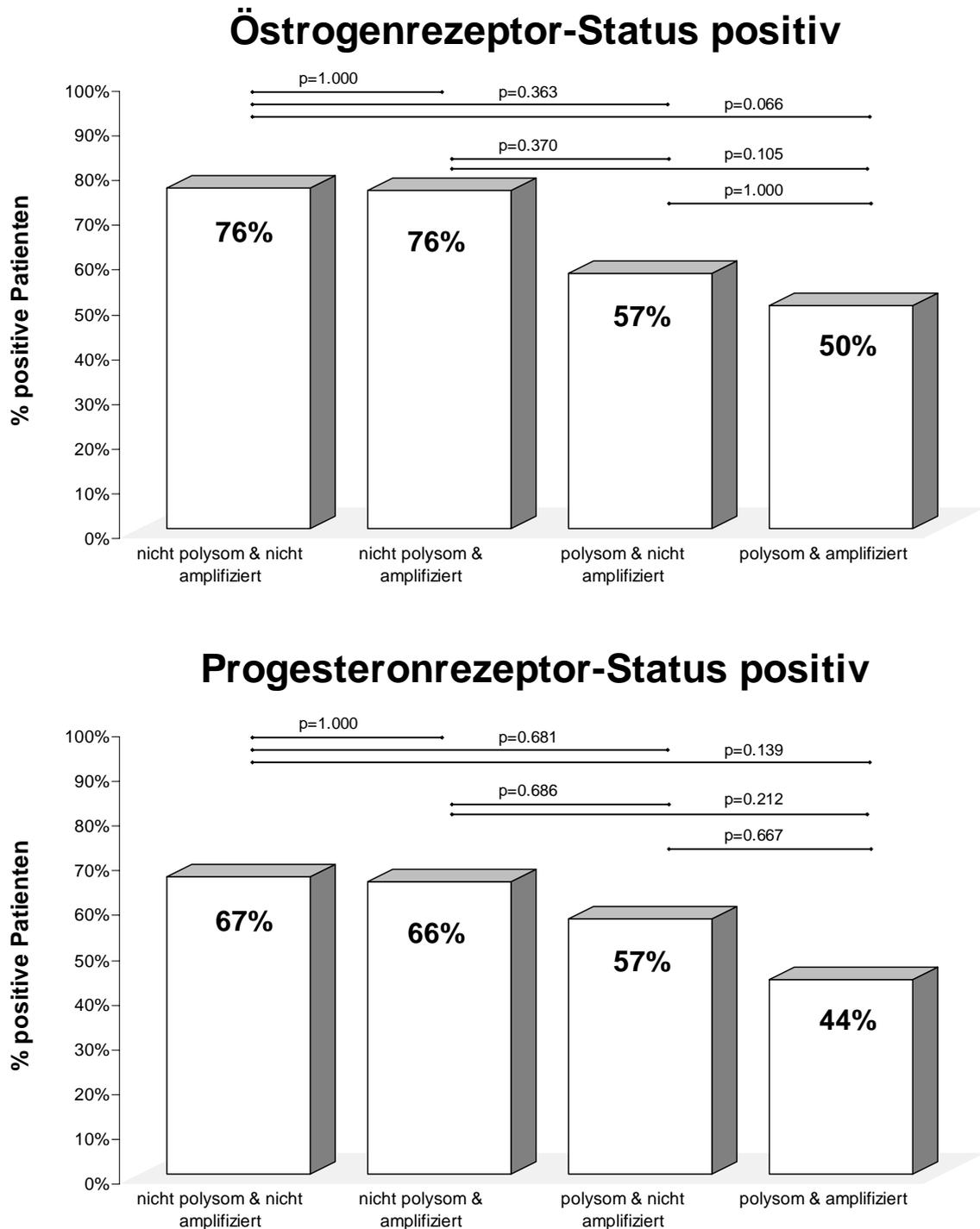


Abbildung 5.10 Positivfrequenzen im Östrogenrezeptor- und im Progesteronrezeptor-Status. p-Werte < 0.008 (adjustiert bei 6 Vergleichen nach Bonferroni, Bortz, 1992) weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

Auch im N-Status waren keine Unterschiede in Detail-Tests (zweiseitige Fisher-Tests) auffindbar, wie die nachfolgende Abbildung 5.11 zeigt.

Abbildung 5.11: Häufigkeit eines Lymphknotenbefalles. p-Werte < 0.008 (adjustiert bei 6 Vergleichen nach Bonferroni, Bortz, 1992) weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

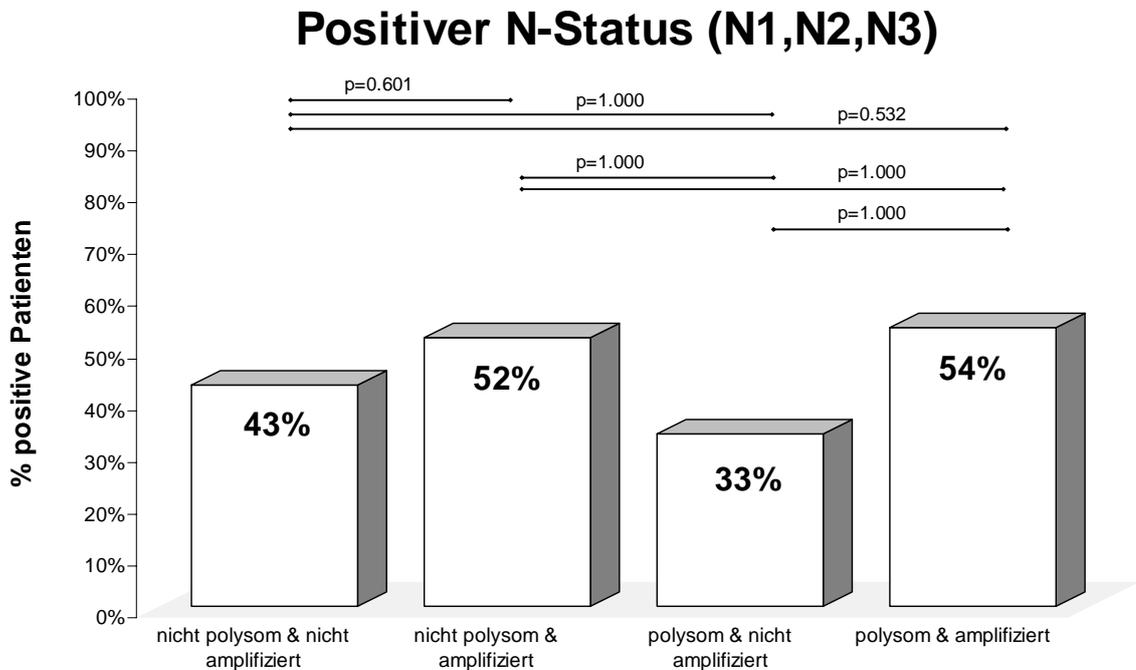
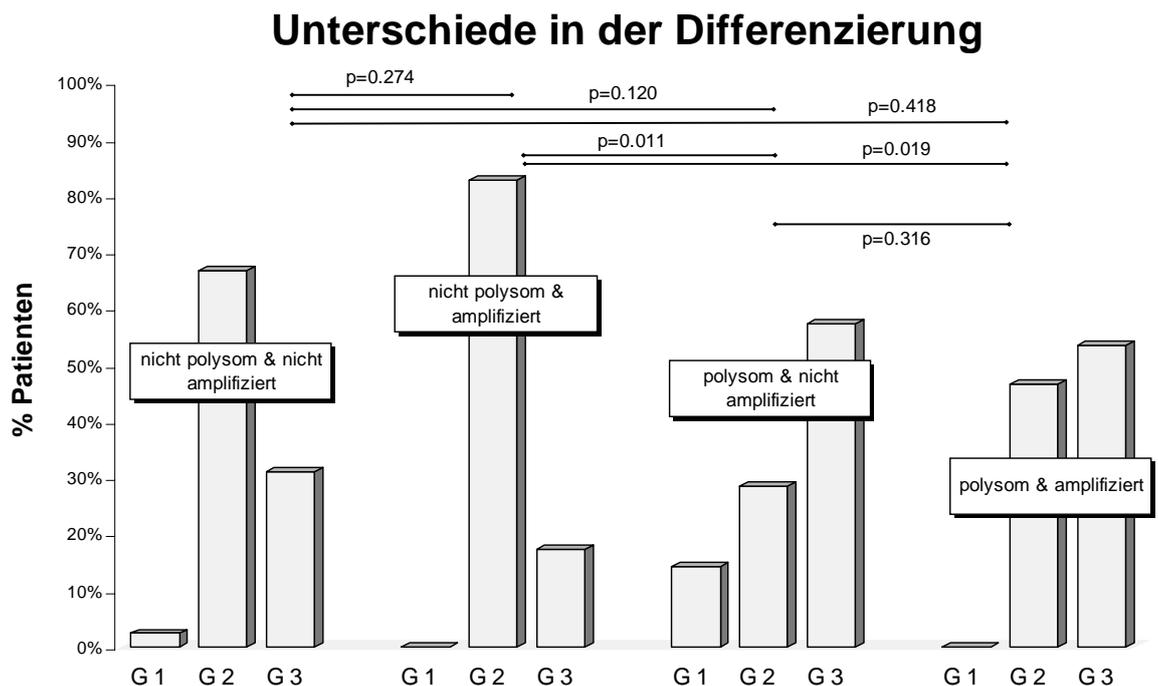


Abbildung 5.12: Unterschiede in der Differenzierung. p-Werte < 0.008 (adjustiert bei 6 Vergleichen nach Bonferroni, Bortz, 1992) weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin



6 Diskussion

6.1 Bedeutung von HER2-neu für das invasive Mammacarcinom

HER2-neu gehört mit drei weiteren Genen, EGFR (HER1), HER3 und HER4, zu einer Familie von Protoonkogenen, deren Produkte vier homologe Tyrosinkinase-Rezeptoren darstellen. Die Rezeptor-Familie weist gemeinsam eine extrazelluläre Liganden-bindende Domäne, eine einzelne transmembrane lipophile Region und eine intrazytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne auf. Nach Bindung eines Liganden kommt es zu einer Dimerisierung zweier Rezeptoren, wobei entweder Homo- oder Heterodimere entstehen, und dadurch zu einer Aktivierung der Kinase mit dem Ergebnis einer Phosphorylierung von bestimmten Tyrosin-Residuen innerhalb der intracytoplasmatischen Rezeptordomäne. Diese phosphorylierten Bestandteile fungieren als Andock-Stationen für Proteine, die intrazelluläre Signal-Kaskaden regulieren, die das Zellwachstum positiv beeinflussen. Bemerkenswert ist, dass für HER2 keine Liganden bekannt sind und der Rezeptor entweder Homodimere oder Heterodimere mit den anderen HER Familienmitgliedern bildet. HER2 ist der bevorzugte Heterodimerisierungs-Partner für die anderen HER Familienmitglieder und HER2-haltige Dimere weisen eine stärkere und verlängerte Signal-Aktivität auf (Hynes NE; 15, Graus-Porta D et al.; 16). Es ist bekannt, dass 20-30% der Mammacarcinome eine HER2 Überexpression aufweisen (Witton CJ; 7). Es konnte gezeigt werden, dass eine HER2 Überexpression und/oder Amplifikation des HER2 Gens prognostisch mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall und kürzerer Überlebenszeit, unabhängig vom Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, assoziiert ist (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al.; 5, Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al.; 6).

Weiterhin kommt einer Überexpression von HER2 eine wesentliche Bedeutung als Prädiktor auf das Ansprechen auf adjuvante Therapien zu. Für die Therapie des Mammacarcinoms stellte die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), der gegen die extrazelluläre Domäne des HER2 Rezeptors gerichtet ist, einen bedeutenden Fortschritt dar. Zunächst nur im fortgeschrittenen metastasierten Stadium eingesetzt, haben die 2005 veröffentlichten Ergebnisse zweier grosser Studien gezeigt, dass bei HER2 positiven Mammacarcinomen das krankheitsfreie Überlebensintervall durch die Gabe von Trastuzumab für ein Jahr nach adjuvanter Chemotherapie signifikant verlängert wird (Piccart-Gebhart MJ et al.; 8), und bei operiertem HER2 positivem Mammacarcinom die Prognose durch die Gabe von Trastuzumab zusätzlich zu adjuvanter Chemotherapie verbessert wird (Romond EH et al.; 9). Eine kürzlich veröffentlichte

Studie hat gezeigt, dass eine HER2 Amplifikation mit einem Ansprechen auf eine Anthracyclinhaltige Chemotherapie assoziiert ist (Pritchard KI et al; 10).

Neben der Rolle als prognostischer und prädiktiver Faktor wird immer wieder die Bedeutung des HER2 für die Entstehung von Mammacarcinomen untersucht. So konnte in einer Studie von Xu et al. nachgewiesen werden, dass eine HER2 Amplifikation bei präinvasiven Mammcarcinomen beginnt und nur selten de novo bei primär invasivem oder metastasierten Carcinom erscheint. Zudem war eine Zunahme der HER2 Amplifikation zwischen benignen und präinvasiven Läsionen nachweisbar. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass einer HER2 Amplifikation sowohl für die Entstehung als auch für die Progression des Mammacarcinoms eine Bedeutung zukommt (Xu R et al.; 17)

6.2 Bedeutung von p53 für das invasive Mammacarcinom

Dem Tumor-Suppressor TP53 Gen, das den Transkriptionsfaktor p53 codiert, kommt eine zentrale Bedeutung für die Wahrung der Stabilität des Genoms zu, indem es bei Beschädigung der DNA Mechanismen zur Unterbrechung des Zellzyklus zur Genomreparatur oder die Einleitung der Apoptose initiiert. Zwei Studien haben zudem gezeigt, dass Wild-Typ p53 dafür verantwortlich ist, dass ein diploider Chromosomensatz erhalten bleibt (Cross SM et al.; 18, Fukasawa K et al.; 19). Ein Verlust des Gens ist wahrscheinlich die häufigste Veränderung eines einzelnen Gens bei Tumoren. Bei Mammacarcinomen sind besonders Mutationen des TP53 Gens mit einer schlechten Prognose und Resistenz gegen Anthracyclin-haltige Chemotherapien in Verbindung gebracht worden (Pharoah et al.; 58, Rahko E et al.; 13).

6.3 Die Bedeutung einer Polysomie des Chromosom 17 im Zusammenhang mit HER2-neu und p53 für das invasive Mammacarcinom

Sowohl das HER2-neu- als auch das TP53 Gen sind auf dem Chromosom 17 lokalisiert, HER2 in der Region 17q12-21.32 und TP53 auf 17p12. Beide Gene bzw. ihre Produkte sind für das Mammacarcinom individuell prognostisch und prädiktiv bedeutsam. In der Studie von Rahko et al. konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Coexpression von HER2-neu und mutiertem p53 das Gesamt-Überleben dramatisch verschlechtert (Rahko E et al.; 13). Es liegt somit nahe, zu überprüfen, ob eine Beziehung zwischen einer Expression dieser beiden Gene und ihrer Produkte und einer Aneusomie des Chromosoms 17 nachweisbar ist.

So konnten Sigurdsson et al. in einer Studie zeigen, dass Mammacarcinomzellen mit abnormaler p53 Protein-Expression statistisch signifikant eine höhere Anzahl von Chromosom 17 Kopien aufwiesen als Tumorzellen des gleichen Carcinoms ohne Nachweis einer p53 Protein-Expression (Sigurdsson et al.; 89). In der vorliegenden Dissertation konnte die p53 Protein-Expression an 17 Mammacarcinom-Fällen mit nachgewiesener CEP17 Polysomie immunhistochemisch geprüft werden. Es zeigte sich zwar ein deutlicher Unterschied zu der nicht polysomen Kontrollgruppe (13 Fälle) mit Mittelwerten von 28% gegenüber 43% bei den CEP17 polysomen Fällen, aber statistisch konnte im Gegensatz zu der Studie von Sigurdsson keine Signifikanz nachgewiesen werden. Dies ist sicher auf die relativ geringe Fallzahl und die grosse Variabilität in der Expression (Werte von 1-90% der Tumorzellen, Standardabweichung 33 bzw 37%) zurückzuführen. So konnte hier die These, dass eine Überexpression von p53 Protein mit einer Polysomie des Chromosoms 17 assoziiert ist, und diese möglicherweise kausal verursacht, nicht unterstützt werden.

Der immunhistochemische Nachweis einer Überexpression des HER2-neu Proteins ist eine etablierte und anerkannte Methode zur Ermittlung des HER2/neu Status (Ma et al.; 21, Wang et al.; 11, Lal et al.; 20) und gehört heute neben der Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status zum diagnostischen Standard bei der pathologisch-anatomischen Begutachtung von Mammacarcinomen.

Ursache für eine HER2-neu Überexpression ist in ca. 90% der Fälle eine Amplifikation des HER2-neu Gens. Als zweiter Mechanismus für eine Erhöhung der HER2 Gen Dosis ist eine Vermehrung der Anzahl der Chromosom 17 Kopien denkbar. Da eine bedeutsame Anzahl von Mammacarcinomen eine CEP17 Aneusomie aufweist, ist die Beziehung zwischen einer CEP17 Polysomie und dem HER2-Gen Status und der HER2-Protein Überexpression immer wieder Gegenstand von Studien. So zeigten Wang et al. in einer Untersuchung an 189 Mammacarcinomen, dass eine HER2 Protein Expression am stärksten mit der Anzahl der Gen-Kopien, gefolgt von der HER2-neu Gen zu CEP17 Ratio und erst an dritter Stelle mit der Anzahl der CEP17 Kopien korreliert. Schlussfolgernd wurde angenommen, dass eine CEP17 Aneusomie häufig bei Mammacarcinomen auftritt, aber wahrscheinlich keinen signifikanten Faktor für die HER2-neu-Protein Überexpression oder die Bestimmung des HER2-neu Status darstellt (Wang S et al.; 11).

In einer aktuellen Studie von Downs-Kelly et al. wurde der Effekt einer CEP17 Polysomie auf die HER2-neu Protein Expression an Mammacarcinom-Fällen untersucht, die zwar eine CEP17 Polysomie aber keine Amplifikation des HER2 Gens

in der FISH Analyse aufwiesen. Es zeigte sich, dass bei einer etwa gleichen Anzahl von 3.0-3.1 von CEP17 Kopien 39% der Fälle keine HER2 Protein Expression aufwiesen. Eine schwache Expression (2+ in der IHC) zeigte sich in 27% der Fälle und eine starke Expression in lediglich 3% der Fälle. In der Studie wurde ausserdem durch Isotope in situ Hybridisierung geprüft, ob eine CEP17 Polysomie ohne HER2-Gen Amplifikation eine erhöhte HER2 mRNA aufwiesen. Alle Fälle zeigten keine Erhöhung der HER2 mRNA-Transkripte, wohingegen bei einer HER2-Gen amplifizierten Kontrollgruppe eine deutlich gesteigerte Expression von HER2 mRNA nachweisbar war. Daraus liess sich folgern, dass eine HER2 Proteinüberexpression bei Fällen mit alleiniger CEP17 Polysomie nicht über eine erhöhte mRNA Expression auf dem Niveau der Transkription erfolgt, sondern über einen nach wie vor unklaren Mechanismus auf posttranslationaler Ebene. Die Autoren fassen zusammen, dass die biologische und klinische Signifikanz einer CEP17 Polysomie im Bezug auf die Herceptin Therapie weiter unklar bleibt und die durch Amplifikation verursachte Erhöhung der HER2 Gen-Dosis weiterhin als wichtigste Ursache einer HER2 Protein Überexpression anzusehen ist. Eine alleinige CEP17 Polysomie dürfte den Autoren zur Folge keinen wesentlichen biologischen Einfluss auf die HER2 Protein Expression haben. Bemerkenswert ist, dass die Ergebnisse der Studie auf eine Untergruppe von CEP17 polysomen Mammacarcinomen hinweisen, die keine echte Amplifikation des HER2 Gens aufweisen und daher ein gleichartiges Verhalten wie nicht amplifizierte Fälle zeigen sollten. Diese Hypothese muss allerdings in klinischen Studien bestätigt werden (Downs-Kelly E et al.; 12). In einer Studie von Ma et al., die den Effekt einer Polysomie des Chromosoms 17 auf die Bestimmung des HER2/neu Status im klinischen Zusammenhang untersuchte, wird in der Konklusion ebenfalls eine Gruppe von CEP 17 polysomen Fällen ohne HER2 Genamplifikation hervorgehoben, die immunhistochemisch eine dreifach positive HER2 Überexpression aufweisen. Die Autoren weisen darauf hin, dass in den Fällen einer CEP17 Polysomie ohne Genamplifikation bei alleiniger Ermittlung des HER2/neu Status durch FISH Analyse eine immunhistochemische Bestimmung der HER2/neu Überexpression erfolgen sollte, um diesen Patienten im Falle einer 3+ Expression ebenfalls eine Trastuzumab-Therapie zukommen lassen zu können. In prospektiven Studien muss geprüft werden, ob ein Benefit bei dieser Subgruppe möglich ist (Ma et al.; 21).

Auch in einer früheren Studie von Lal et al.(20) zur Untersuchung des Einflusses einer CEP17 Polysomie auf die immunhistochemische Expression des HER2/neu Proteins fanden die Autoren eine kleine Gruppe von Fällen mit HER2/neu 3+ Expression ohne Amplifikation mit CEP17 Polysomie, und schlossen, dass eine

Überexpression des HER2/neu Proteins auf eine erhöhte Anzahl der Chromosom17 Kopie zurückzuführen sein könnte.

In der vorliegenden Dissertation wurde überprüft, ob eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors mit einer CEP17 Polysomie einhergeht und wie oft dies der Fall ist. Es konnte gezeigt werden, dass 23% der untersuchten Carcinome mit einer HER2-Protein Überexpression (3+ und 2+) eine CEP17 Polysomie aufwiesen. Diese war in 71% der Fälle mit einer Amplifikation des HER2-neu Gens assoziiert. Demgegenüber wiesen nur 39% der CEP 17 eusomen Fälle eine Gen-Amplifikation auf. Der Unterschied ist statistisch hochsignifikant. Das Ergebnis ist konsistent mit der Literatur (Lal et al 2003; 20, Ma et al.2005; 21, Downs-Kelly et al.2005; 12) Interessant war, dass auch in dieser Arbeit eine Subgruppe von 3 (12,5%) der CEP 17 polysomen Fälle mit 3+ HER2 Protein Überexpression keine Amplifikation des HER2 Gens aufwiesen. Diese Daten decken sich mit denen in der Literatur (3-15%, Downs-Kelly et.al; 12). Auch hier wäre es interessant zu verfolgen, welchen biologischen Einfluss diese Konstellation für den Krankheitsverlauf der betroffenen Patienten hat.

6.4 Beziehung zwischen CEP17 Polysomie und Östrogen-und Progesteronrezeptor-Status

Derzeit kommt dem Hormonrezeptorstatus mehr denn je eine besondere Bedeutung für das invasive Mammacarcinom zu, steht doch nicht mehr die Einteilung in Risikogruppen für die Auswahl der adjuvanten Therapie im Vordergrund, sondern die endokrine Sensibilität. Dies bedeutet, dass der Östrogenrezeptor (ER) und der Progesteronrezeptor (PR) obligat quantitative prädiktive Marker sind: Man unterscheidet derzeit drei Kategorien von Mammacarcinomen im Bezug auf das Ansprechen auf eine endokrine Therapie, nämlich den endokrin sensiblen, unsicheren und nicht sensiblen Typ, in Abhängigkeit vom Ausmass der ER/PR Expression (Goldhirsch et al.; 1). In dieser Dissertation wurde daher überprüft, ob eine Polysomie von Chromosom 17 einen Einfluss auf die Expression der beiden Hormonrezeptoren aufwies. In der Tat war eine CEP17 Polysomie statistisch signifikant mit einem Verlust der Östrogenrezeptor-Expression korreliert. So wiesen 52% der CEP17 polysomen gegenüber 76% der eusomen Carcinome einen positiven ER auf. PR positiv waren 66% der eusomen und 48% der CEP17 polysomen Fälle, was eine ähnliche Tendenz erkennen lässt. Die Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant, offensichtlich fallzahlbedingt. Unter Berücksichtigung einer gleichzeitigen HER2-Gen Amplifikation zeigten 76% der CEP17 eusomen/HER2 nicht amplifizierten und 76% der CEP17 eusomen /HER2 amplifizierten Carcinome einen

positiven ER-Status. 57% der CEP17 polysomen/HER2 nicht amplifizierten Fälle und 50% der CEP17 polysomen/HER2 amplifizierten Fälle zeigten einen positiven ER-Status. Tendenziell ist auch hier eine Beziehung zwischen einer CEP17 Polysomie und insbesondere einer CEP17 Polysomie /HER2 Amplifikation und einem Verlust der ER-Expression erkennbar, die statistisch aber, wohl fallzahlbedingt, nicht signifikant war. Die gleiche Tendenz zeigte sich bei der PR-Expression mit der niedrigsten Rate von 44% in der Gruppe der CEP17 polysomen/HER2 amplifizierten Fälle, 67% bei den CEP17 polysomen/HER2 nicht amplifizierten, 66% bei den CEP17 polysomen/HER2 amplifizierten und 67% der CEP17 polysomen/HER2 nicht amplifizierten Carcinome, konnte aber statistisch nicht abgesichert werden. Dieses Ergebnis kann zum einen bedeuten, dass die Gruppe der HER2 überexprimierten, ER negativen Fälle dem Typ 4 (HER2+/ER-) der durch Gene Profiling ermittelten molekularen Klassifikation der Mammacarcinome (Sorlie et al.; 4) entsprechen und dieser signifikant häufiger mit einer CEP17 Polysomie assoziiert ist. Zum anderen könnte darüber spekuliert werden, ob die fehlende Expression des ER nicht auf einem tatsächlichen Verlust des ER beruht, sondern zurückzuführen ist auf eine verstärkte Interaktion zwischen HER2 und ER, bedingt durch Überexpression von HER2 als Folge der CEP17 Polysomie. Interessanterweise haben in einer kürzlich veröffentlichte Studie Munzone et al. zeigen können, dass bei einigen Patienten mit primär ER negativem Mammacarcinom nach Herzeptin Therapie eine Konversion zu einem positiven ER Status nachweisbar war, und diese Patienten von einer daraufhin eingesetzten endokrinen Therapie profitieren konnten (Munzone et al.; 72).

6.5 Beziehung zwischen CEP17 Polysomie und den histopathologischen Prognosefaktoren

Zusätzlich zum HER2/neu und p53 Status wurde in der vorliegenden Dissertation geprüft, ob statistisch bedeutsame Relationen zwischen einer CEP17 Polysomie und den traditionellen histo-pathologischen Prognosefaktoren, nämlich dem histologischen Typ, der Tumorgrosse, dem axillären Lymphknotenstatus, und dem Differenzierungsgrad sowie dem Patientenalter erkennbar waren. Hierbei zeigte sich, dass als einziger Parameter der Differenzierungsgrad statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich zwischen der Gruppe der CEP17 polysomen und polysomen Carcinome aufwies. Wenig differenzierte Carcinome (G3) traten häufiger zusammen mit einer Polysomie 17 auf (55%). Dagegen herrschte bei der Gruppe der CEP17 polysomen Carcinome ein mittlerer Differenzierungsgrad (G2) vor (73%). Dieser Unterschied war auch dann statistisch signifikant, wenn man zusätzlich eine Amplifikation des HER2-neu Gens berücksichtigt. Dieser Befund entspricht dem einer

Studie von Prati et al 2005, die ebenso zeigen konnte, dass bei HER2-neu amplifizierten Carcinomen ein höherer Grad, entsprechend einer schlechteren Differenzierung, vorherrschte (Prati R et al.; 22).

Beim histologischen Typ dominierte das invasive ductale Carcinom mit 87% bei den eusomen und 91% bei den CEP17 polysomen Fällen. Andere Typen waren die Ausnahmen. Auch unter der Berücksichtigung einer gleichzeitigen HER2-neu Amplifikation waren keine signifikanten Unterschiede zwischen einer CEP17 Polysomie und dem histologischen Typ nachweisbar.

Auch im Bezug auf das Patientenalter, den axillären Nodalstatus und die Tumorgrosse konnten keine Unterschiede zwischen der Gruppe der CEP17 polysomen und eusomen Fälle nachgewiesen werden, auch wenn zusätzlich eine HER2-Amplifikation berücksichtigt wurde. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Studie von Prati et al.(22).

6.6 Bedeutung der Chromosom 17 Polysomie für die Bestimmung des HER2-neu Status mit der FISH- Methode

Zur Bestimmung der Anzahl der HER2/neu Gen-Kopien mit der in situ Hybridisierung durch fluoreszenzmarkierte Sonden stehen zwei Methoden zur Verfügung. Die eine nutzt eine einfarbigen Sonde, die nur an das HER2/neu Gen bindet, die andere bietet eine zweifarbige Analyse mit zwei Sonden, eine davon ebenfalls gegen das HER2/neu Gen, die andere gegen die Centromer-Region des Chromosom 17 gerichtet. Publierte Studien haben eine Konkordanz von 96% bei Vergleichen der beiden Methoden gezeigt (Lal et al.; 90). Für die Diskrepanz ist hauptsächlich eine erhöhte Anzahl der Chromosom 17 Kopien pro Zellkern verantwortlich. Bei einem Assesment der HER2 Signale mit der einfarbigen Methode käme es zu einer falsch positiven Interpretation der Gen Amplifikation und damit des HER2-neu-Status, wenn eine durchschnittliche Signalzahl von >4 als HER2-amplifiziert angesehen würde. Mit der zweifarbigen Methode, die eine Amplifikation bei einer Ratio zwischen HER2-Signalzahl und CEP17-Signalzahl >2 annimmt, wäre im gleichen Fall eine Amplifikation des HER2/neu Gens nicht angegeben worden. Die zweifarbige Methode hat den Vorteil, dass zum einen eine scheinbare Aneusomie von CEP17, bedingt durch eine grosse Anzahl von Tumorzellen in G2 Phase des Zellzyklus mit 4 CEP 17 Kopien bei Tumoren mit hoher Mitoserate durch die gleichzeitige Erhöhung der HER2 Gen Kopien zu einer korrigierten Ratio führt, zum anderen eine tatsächliche CEP17 Polysomie erkannt und berücksichtigt werden kann. Allerdings ist hierbei der Effekt der Zerteilung der Zellkerne in histologischen Schnittpräparaten zu berücksichtigen.

Dies führt dazu, dass normalerweise weniger als 2 CEP17 Kopien (1.4-1.7) pro Kern gezählt werden (Downs-Kelly et al.; 12). In dieser Dissertation wurde nach der Studie von Downs-Kelly et al eine Polysomie als CEP17 Signal-Anzahl von 2.1 oder grösser definiert.

7 Schlussfolgerungen

Beim invasiven Mammacarcinom ist in Fällen mit einer immunhistochemischen Überexpression des HER2-neu Proteins eine Polysomie des Chromosoms 17 sowohl bei HER2/neu Gen amplifizierten als auch bei nicht amplifizierten Fällen anzutreffen. Eine Polysomie des Chromosoms 17 geht signifikant häufiger, aber nicht zwingend mit einer HER2/neu Gen Amplifikation einher.

Für die korrekte Interpretation des HER2-neu Status mit der FISH Methode ist die häufige Assoziation einer Amplifikation des HER2/neu Gens mit einer CEP17 Polysomie bei der Auswertung zu berücksichtigen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Ein Zusammenhang zwischen einer immunhistochemischen p53 Expression und einer Polysomie des Chromosoms 17 konnte nicht gezeigt werden.

8 Zusammenfassung

Das HER2/neu und das TP53 Gen und ihre Proteinprodukte sind als negative Prognosefaktoren und als prädiktive Faktoren für den Erfolg einer modernen und gezielten adjuvanten Therapie für das invasive Mammacarcinom von erheblicher Bedeutung. Beide Gene sind auf dem Chromosom 17 lokalisiert, welches im Verlauf der Onkogenese häufig Mutationen aufweist. Es ist daher seit einiger Zeit Gegenstand von Studien, ob Zusammenhänge zwischen einer Aneusomie des Chromosoms 17 und diesen beiden Genen nachgewiesen werden können und welche Relevanz diesen zukommt. In dieser Dissertation wurde an Fällen von invasiven Mammacarcinomen mit immunhistochemisch nachgewiesener HER2-neu Protein Überexpression (HercepTest®; HER2-neu 2+ und HER2-neu 3+) mit der Dual Color FISH Methode (PathVision®) untersucht, wie oft eine Polysomie 17 nachweisbar war und welche Korrelationen sich hinsichtlich einer HER2/neu Amplifikation und morphologischen Prognosefaktoren sowie dem Östrogen – und Progesteronrezeptorstatus ermitteln lassen. Weiterhin wurde an einer Gruppe von nachweislich CEP17 polysomen Carcinomen und einer eusomen Kontrollgruppe immunhistochemisch die Expression des p53 Proteins untersucht und die Ergebnisse ebenfalls mit einer HER2/neu Amplifikation, morphologischen Prognosefaktoren und dem Hormonrezeptorstatus korreliert. Eine Polysomie des Chromosoms 17 ging signifikant häufiger mit einer HER2/neu Amplifikation einher, war jedoch nicht zwingend damit verbunden. Somit lässt sich die Hypothese, dass eine CEP17 Polysomie ursächlich eine Erhöhung der Anzahl der HER2/neu Gen Kopien bewirkt und damit die Überexpression des membrangebundenen Rezeptorproteins, welches das eigentliche Ziel einer Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herzeptin®) darstellt, nur bedingt unterstützen. Analog zu anderen aktuellen Studien liess sich in dieser Dissertation eine sehr kleine Subgruppe von CEP17 polysomen Fällen finden, die eine stark positive HER2-neu Protein Überexpression (HER2-neu 3+) aufwiesen, aber nicht amplifiziert waren. Die Bedeutung dieser Konstellation für das biologische und therapeutische Verhalten insbesondere gegenüber Herzeptin ist in prospektiven Studien zu prüfen. Eine CEP17 Polysomie war, in Übereinstimmung mit den Daten in der Literatur, signifikant mit dem höchsten Malignitätsgrad, unabhängig von einer HER2/neu Amplifikation, assoziiert. Dieser Befund unterstützt den prognostisch ungünstigen Einfluss von Tumoren mit komplexen genomischen Mutationen. Als zweite signifikante Korrelation fand sich ein negativer Östrogenrezeptorstatus in Assoziation mit einer CEP17 Polysomie. Keine signifikanten Korrelationen fanden sich zwischen einer CEP17 Polysomie und den übrigen morphologischen Prognosefaktoren (Tumorgrosse, Nodalstatus,

histologischer Typ, Alter). Eine signifikante Beziehung zwischen dem Ausmass der p53 Expression und einer CEP17 Polysomie war, wohl wegen der niedrigen Fallzahl, nicht zu erheben.

9 Literaturverzeichnis

1. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. (2005): Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol.* 2005 Oct;16(10):1569-83
2. Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA. (1992): C-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1992 Mar 1; 52(5):1107-13.
3. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, Schonau A, Gunnarsdottir K, Olsen KE, Mouridsen H, Ejlersen B; Danish Breast Cancer Cooperative Group (2006): Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20; 23(30):7483-90. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2006 Feb 20; 24 (6):1015.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Borresen-Dale AL (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9; 235(4785):177-82.
6. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. (1989): Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12
7. Witton CJ. (2003): Structure of HER receptors and intracellular localisation of downstream effector elements gives insight into mechanism of tumour growth promotion. *Breast Cancer Res.* 2003; 5(4):206-7.

8. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata, H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. (2005): Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20; 353(16):1659-72.
9. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N.(2005): Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20; 353(16):1673-84.
10. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group.(2006): HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006 May 18;354(20):2103-11.
11. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, Hynan L, Ashfaq R.(2002): Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol.* 2002 Feb;15(2):137-45.
12. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, Tubbs RR, Skacel M, Grogan T, Roche P, Hicks DG.(2005): The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: a fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study. *Am J Surg Pathol.* 2005 Sep;29(9):1221-7.

13. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A.(2003): A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 2003 Mar; 39(4):447-53.
14. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I.(1991): The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
15. Hynes NE. (2000): Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000; 2(3):154-7. Epub 2000 Apr 17. Review.
16. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. (1997): ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 1997 Apr 1;16(7):1647-55.
17. Xu R, Perle MA, Inghirami G, Chan W, Delgado Y, Feiner H. (2002): Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu-overexpressing and –nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol*. 2002 Feb;15(2):116-24.
18. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ. (1995): A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*. 1995 3;267(5202):1353-6.
19. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. (1996): Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*. 1996 22; 271(5256):1744-7.
20. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. (2003): Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn*. 2003 Aug; 5(3):155-9.

21. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ, Larsimont D. (2005): Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. Clin Cancer Res. 2005 Jun 15; 11(12):4393-9.
22. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. (2005): Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. Breast J. 2005 Nov-Dec ;11(6):433-9.
23. UICCTNM Classification of Malignant Tumours Sobin LH, Wittekind Ch(Editors), 6th edition 2002
24. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsreister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch Institut (Herausgeber), Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends (Broschüre), 5.Ausgabe,2006, 52-55
25. Tavassoli FA, Devilee P (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press:Lyon 2003
26. Molekulare Humangenetik / Tom Strachan ; Andrew P. Read. Aus dem Engl. übers. von Lothar Seidler. - 3. Aufl.. - München ; Heidelberg : Elsevier
27. Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Tagett R, Lorig B, Giaconia A, Benzi A, Devillard E, Jacquemier J, Viens P, Nguyen C, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. Hum Mol Genet. 2002 Apr 15;11(8):863-72
28. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH.(2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.

29. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, SchreiberGJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999-2009
30. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):966-78. Review
31. Elston CW, Gresham GA, Rao GS, Zebro T, Haybittle JL, Houghton J, Kearney G. The cancer research campaign (King's/Cambridge trial for early breast cancer: clinico-pathological aspects (1982). *Br J Cancer.* 1982 May;45(5):655-69.
32. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure (1984) *Cancer.* 1984 Feb 1;53(3 Suppl):712-23
33. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer (1989) *Cancer.* 1989 Jan 1;63(1):181-7
34. Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Save-Soderbergh J, Davis BW, Reed R, Torhorst J, Golouh R, Peterson HF, Price KN, et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. (1992) *J Clin Oncol.* 1992 May;10(5):696-705
35. Dixon JM, Page DL, Anderson TJ et al. (1985): Long term survivors after breast cancer. *Br.J Surg* 72:445-448

-
36. Dawson P, Ferguson DJ, Karrison T (1982). The pathologic findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer* 50: 2131-2138

 37. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology*. 1995 Sep;27(3):219-26.

 38. Roses DF, Bell DA, Flotte TJ, Taylor R, Ratach H, Dubin N. Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (T1N0M0) breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1982 Dec;78(6):817-20.

 39. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 1993 Nov;11(11):2090-100.

 40. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*. 1993 Apr 15;71(8):2507-14.

 41. Fisher ER, Costantino J, Fisher B, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. *Cancer*. 1993 Mar 15;71(6 Suppl):2141-50.

 42. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol*. 1999 Dec;189(4):521-6.

 43. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Comparative genomic

-
- hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol.* 1999 Mar;187(4):396-402.
44. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2001 Jun;27(3):137-42. Review.
45. Chen T, Dhingra K, Sahin A, Sneige N, Hortobagyi G, Aldaz CM. Technical approach for the study of the genetic evolution of breast cancer from paraffin-embedded tissue sections. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39(2):177-85.
46. Chen YY, Schnitt SJ. Prognostic factors for patients with breast cancers 1cm and smaller. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51(3):209-25. Review.
47. Chen T, Sahin A, Aldaz CM. Deletion map of chromosome 16q in ductal carcinoma in situ of the breast: refining a putative tumor suppressor gene region. *Cancer Res.* 1996 Dec 15;56(24):5605-9.
48. Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med.* 1995 Oct;1(10):1029-34.
49. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1994;(16):35-42.
50. Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):811-4.
51. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2505-12.

52. Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, West M, Nevins JR, Huang AT. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet*. 2003 May 10;361(9369):1590-6.
53. Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Semin Oncol*. 2001 Feb;28(1):53-67. Review.
54. Leal C, Costa I, Fonseca D, Lopes P, Bento MJ, Lopes C. Intracystic (encysted) papillary carcinoma of the breast: a clinical, pathological, and immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 1998 Oct;29(10):1097-104.
55. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*. 1994 Jul 1;74(1 Suppl):381-400. Review.
56. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*. 1994 May;12(5):888-94.
57. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):227-38. Review.
58. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(12):1968-73.
59. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
60. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. The Role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *Breast Cancer*. 2001;8(3):171-83. Review.

61. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Apr 15;19(8):2334-56. Review.
62. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today*. 1996 Jan;2(1):32-7. Review.
63. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2001 Dec;1(3):233-40. Review.
64. Kepple J, Henry-Tillman RS, Klimberg VS, Layeeque R, Siegel E, Westbrook K, Korourian S. The receptor expression pattern in ductal carcinoma in situ predicts recurrence. *Am J Surg*. 2006 Jul;192(1):68-71.
65. Fernandopulle SM, Cher-Siangang P, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. *Pathology*. 2006 Jun;38(3):219-22.
66. Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. *Breast J*. 2005 Jul-Aug;11(4):278-80.
67. Rosenthal SI, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS. Comparison of HER-2/neu oncogene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in lobular and ductal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Mar;10(1):40-6.
68. Creighton CJ, Hilger AM, Murthy S, Rae JM, Chinnaiyan AM, El-Ashry D. Activation of mitogen-activated protein kinase in estrogen receptoralpha-positive breast cancer cells in vitro induces an in vivo molecular phenotype of estrogen receptor alpha-negative human breast tumors. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3903-11.

-
69. Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol.* 2006 May;17(5):818-26. Epub 2006 Feb 23.
70. Kim HJ, Cui X, Hilsenbeck SG, Lee AV. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 2):1013s-1018s.
71. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7721-35. Review.
72. Munzone E, Curigliano G, Rocca A, Bonizzi G, Renne G, Goldhirsch A, Nole F. Reverting estrogen-receptor-negative phenotype in HER-2-overexpressing advanced breast cancer patients exposed to trastuzumab plus chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2006;8(1):R4. Epub 2005 Dec 7.
73. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, D'Agostino D, Caputo F, Canello G, Montagna E, Malorni L, Zinno L, Lauria R, Bianco AR, De Placido S. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4741-8.
74. Mike West, Carrie Blanchette, Holly Dressman, Erich Huang, Seiichi Ishida, Rainer Spang, Harry Zuzan, John A. Olson, Jr., Jeffrey R. Marks, and Joseph R. Nevins Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles *PNAS*, Sep 2001; 98: 11462 - 11467.
75. Sofia Gruberger, Markus Ringnér, Yidong Chen, Sujatha Panavally, Lao H. Saal, Åke Borg, Mårten Fernö, Carsten Peterson, and Paul S. Meltzer Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Is Associated with Remarkably Distinct Gene Expression Patterns *Cancer Res.*, Aug 2001; 61: 5979 – 5984

76. Christos Sotiriou, Soek-Ying Neo, Lisa M. McShane, Edward L. Korn, Philip M. Long, Amir Jazaeri, Philippe Martiat, Steve B. Fox, Adrian L. Harris, and Edison T. Liu Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study PNAS, Sep 2003; 100: 10393 – 10398
77. Therese Sørlie, Robert Tibshirani, Joel Parker, Trevor Hastie, J. S. Marron, Andrew Nobel, Shibing Deng, Hilde Johnsen, Robert Pesich, Stephanie Geisler, Janos Demeter, Charles M. Perou, Per E. Lønning, Patrick O. Brown, Anne-Lise Børresen-Dale, and David Botstein Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets PNAS, Jul 2003; 100: 8418 - 8423.
78. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2004 Dec 30;351(27):2817-26. Epub 2004 Dec 10.
79. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. J Clin Oncol. 2001 Sep 15;19(18):3808-16.
80. Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S, Proia AD, Murray J, Renshaw L, Faratian D, Thomas J, Dowsett M, Krause A, Evans DB, Miller WR, Dixon JM. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. J Clin Oncol. 2006 Jul 1; 24(19):3019-25. Epub 2006 Jun 5.
81. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. Clin Cancer Res 2005; 11: 865s-870s (Suppl.)
82. Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Culine S, Theillet C. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the

-
- prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 Mutations Cancer Res. 2000 Feb 15;60(4):1077-83.
83. Wang XW, Harris CC .TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancertherapy Cancer Surv. 1996;28:169-96.
84. Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA. Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death Rev Invest Clin. 2001 May-Jun;53(3):266-73.
85. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies J Natl Cancer Inst. 1996 Oct 16;88(20):1442-55.
86. Guran S, Tunca Y, Imirzalioglu N. Hereditary TP53 codon 292 and somatic P16INK4A codon 94 mutations in a Li-Fraumeni syndrome family. Cancer Genet Cytogenet. 1999 Sep;113(2):145-51.
87. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breastcancer: a validation study. Mod Pathol. 2004 Dec;17(12):1545-54. Erratum in: Mod Pathol. 2005 Mar;18(3):461 Qian, Zho [corrected to Qian, Zhang]
88. Schuurin E, Verhoeven E, van Tinteren H, Peterse JL, Nunnink B, Thunnissen FB, Devilee P, Cornelisse CJ, van de Vijver MJ, Mooi WJ, et al. Amplification of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer. Cancer Res. 1992 Oct 1;52(19):5229-34.
89. Sigurdsson S, Bodvarsdottir SK, Anamthawat-Jonsson K, Steinarsdottir M, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE. p53 abnormality and chromosomal instability in the same breast tumor cells. Cancer Genet Cytogenet. 2000 Sep;121(2):150-5.
90. Lal P, Salazar PA, Hudis CA, Ladanyi M, Chen B. HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: a single-institution

experience of 2,279cases and comparison of dual-color and single-color scoring. Am J Clin Pathol. 2004 May;121(5):631-6. Erratum in: Am J Clin Pathol. 2004Feb;6(1):58.

91. Vousden KH p53: Death Star. Cell 2000, Vol.103, 691-4

10 Danksagung

Mein Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. Christopher Poremba, dem stellvertretenden Leiter des Institutes für Pathologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf und Herrn Prof. Dr. med. Gösta Fischer, dem Leiter des Institutes für Pathologie Wilhelmshaven für die freundliche Betreuung meiner Promotion und die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich postum Frau Priv. Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Monika Korabiowska, Leiterin der molekularpathologischen Abteilung des Institutes für Pathologie Wilhelmshaven für ihre exzellente und kompetente Betreuung bei der Verfassung dieser Arbeit. Ihren plötzlichen Tod bedauere ich sehr. Weiterhin möchte ich Frau Claudia Wagner für ihre fachliche und praktische Unterstützung bei den FISH-Analysen und Frau Ute Philipp und Frau Christina Rosenhan für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen herzlich danken. Nicht zuletzt gebührt mein besonderer Dank meiner Kollegin Frau Dr. med. Josiane Bédrossian-Pfingsten, die durch ihre Unterstützung bei der Routinearbeit in unserem Institut für Pathologie in Remscheid diese Promotion erst möglich gemacht hat. Herrn Ulrich Stefenelli danke ich für die Durchführung der statistischen Analytik.

11 Lebenslauf

Am 14. Mai 1960 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Margrit und Dr. med. Jochen Christians in Oberhausen, Nordrhein-Westfalen, geboren. 1979 erlangte ich am Bertha-von-Suttner Gymnasium in Oberhausen die allgemeine Hochschulreife. 1980 bis 1985 studierte ich Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf, gefolgt von einem Praktischen Jahr an den Städtischen Krankenanstalten in Krefeld. Im Juni 1986 bestand ich erfolgreich die 3. Ärztliche Prüfung und erlangte die Approbation. 1986-1992 absolvierte ich die fachärztliche Weiterbildung am Institut für Pathologie Oberhausen unter der Leitung von Herrn Dr. med. Jens Bubenzer und am Institut für Pathologie Remscheid unter der Leitung von Herrn Dr. med. Uwe Boenigk. Am 24.02.1993 erhielt ich die Anerkennung zur Fachärztin für Pathologie. Vom 01.03.1993 bis zum 07.12.1993 war ich als freie Mitarbeiterin am Institut für Pathologie in Remscheid tätig. Es folgte am 08.12.1993 die Niederlassung in Gemeinschaftspraxis mit Dr. Uwe Boenigk, am 01.01.1997 als Teilinhaber. Seit dem 01.02.2003 leite ich das Institut für Pathologie Remscheid in Gemeinschaftspraxis mit Frau Dr. med. Josiane Bédrossian-Pfingsten. Mit der vorliegenden Dissertation begann ich im März 2005.

Das HER2/neu und das TP53 Gen und ihre Proteinprodukte sind als negative Prognosefaktoren und als prädiktive Faktoren für den Erfolg einer modernen und gezielten adjuvanten Therapie für das invasive Mammacarcinom von erheblicher Bedeutung. Da beide Gene auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind, wird seit einiger Zeit in Studien untersucht, ob Zusammenhänge zwischen einer Aneusomie des Chromosoms 17 und diesen beiden Genen nachgewiesen werden können und welche Relevanz diesen zukommt. In dieser Dissertation wurde an Fällen von invasiven Mammacarcinomen mit immunhistochemisch nachgewiesener HER2/neu-Protein Überexpression (HercepTest®; HER2-neu 2+ und HER2-neu 3+) mit der Dual Color FISH Methode (PathVision®) untersucht, wie oft eine Polysomie 17 nachweisbar war und welche Korrelationen sich hinsichtlich einer HER2/neu Amplifikation und morphologischen Prognosefaktoren sowie dem Östrogen – und Progesteronrezeptorstatus ermitteln lassen. Weiterhin wurde an einer Gruppe von nachweislich CEP17 polysomen Carcinomen und einer eusomen Kontrollgruppe immunhistochemisch die Expression des p53 Proteins untersucht und die Ergebnisse ebenfalls mit einer HER2/neu Amplifikation, morphologischen Prognosefaktoren und dem Hormonrezeptorstatus korreliert. Eine Polysomie des Chromosoms 17 ging signifikant häufiger mit einer HER2/neu Amplifikation einher, war jedoch nicht zwingend damit verbunden. Somit lässt sich die Hypothese, dass eine CEP17 Polysomie ursächlich eine Erhöhung der Anzahl der HER2/neu Gen Kopien bewirkt und damit die Überexpression des membrangebundenen Rezeptorproteins, nur bedingt unterstützen. Analog zu anderen aktuellen Studien liess sich in dieser Dissertation eine sehr kleine Subgruppe von CEP17 polysomen Fällen finden, die eine stark positive HER2-neu Protein Überexpression (HER2-neu 3+) aufwiesen, aber nicht amplifiziert waren. Die Bedeutung dieser Konstellation für das biologische und therapeutische Verhalten der Mamacarcinome, insbesondere gegenüber Herzeptin®, ist in prospektiven Studien zu prüfen. Eine CEP17 Polysomie war in Übereinstimmung mit den Daten in der Literatur signifikant mit dem höchsten Malignitätsgrad, unabhängig von einer HER2/neu Amplifikation, assoziiert. Dieser Befund unterstützt den prognostisch ungünstigen Einfluss von Tumoren mit komplexen genomischen Mutationen. Als zweite signifikante Korrelation fand sich ein negativer Östrogenrezeptorstatus in Assoziation mit einer CEP17 Polysomie. Keine signifikanten Korrelationen fanden sich zwischen einer CEP17 Polysomie und den übrigen morphologischen Prognosefaktoren (Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Typ, Alter). Eine signifikante Beziehung zwischen dem Ausmass der p53 Expression und einer CEP17 Polysomie war, wohl wegen der niedrigen Fallzahl, nicht zu erheben.

Gez: Prof. Dr. med. Christopher Poremba