

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

Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
- Funktionsbereich Cytopathologie -

Modifizierte Auswertung der Fluoreszenz-*in situ*- Hybridisierung (FISH)
von HER-2/neu an zytologischen Präparaten metastasierter Karzinome

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Svetlana Zalesski

2020

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker
Referent: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld
Korreferent: Prof. Dr. med. U. Germing

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Die Bestimmung des HER-2/neu-Status ist Voraussetzung zur Entscheidung über die Verwendung von Trastuzumab in der adjuvanten Behandlung maligner Tumoren. Entsprechende FISH-Untersuchungen basieren auf einer vergleichenden Analyse von Signalen der beiden chromosomalen Sonden LSI 17.2 (HER-2/neu-Region auf dem Chromosom 17) und CEP 17 (Zentromerregion des Chromosoms 17). Im Jahr 2013 wurde vom ASCO eine Modifikation der Auswertung vorgenommen, die auf Erfahrungen an histologisch ausgewertetem Tumorgewebe basierte. Zu dem Quotienten der Signale [LSI 17.2 / CEP 17] kam als zweites Kriterium die durchschnittliche Signalzahl für LSI 17.2 hinzu, so dass jetzt zwei Auswertealgorithmen parallel angewandt werden. Erfahrungen an zytologischen Präparaten fehlen bisher weitestgehend.

In unserer retrospektiven klinischen Untersuchung wurde auf 106 zwischen 2007 und 2014 in der Routinediagnostik bereits auf ihren HER-2/neu-Status untersuchte zytologische Fälle nachträglich der neue Auswertealgorithmus angewandt und methodisch und klinisch ausgewertet.

Die zytologischen Tumorproben stammen von 96 Frauen und 10 Männern (mittleres Patientenalter: 64 Jahre) mit metastasierten Karzinomen, davon 84 Erguskarzinomen, 8 Lebermetastasen, 7 LK-Metastasen und 7 andere. 92 der Primärtumoren waren Mammakarzinome, 11 Magenkarzinome, drei andere. Das klinische Follow-Up wurde in Kooperation mit den einsendenden Kliniken ermittelt und stand für 99 der 106 Fälle zur Verfügung.

Die FISH-Untersuchungen wurden gemäß den Standard Operation Procedures des Schwerpunktes Cytopathologie durchgeführt. Ausgewertet wurden im Mittel 32 Tumorzellen. Die Zahl der LSI 17.2- und der CEP 17-Signale wurden Zelle für Zelle dokumentiert. Ein Signalquotient ≥ 2 bzw. eine durchschnittliche LSI 17.2-Signalzahl ≥ 6 galten als positiv.

65 der 106 Fälle (61,3%) waren mit beiden Auswertemethoden negativ, 22 (20,8%) mit beiden positiv. Nur über den Signalquotienten waren 8 Fälle positiv (7,5%), rein über die Signalzahl 11 Fälle (10,4%). Die Konkordanz betrug 82,1%. Ähnliche Zahlen ergaben sich, wenn man die Mammakarzinome als der häufigsten Tumorgruppe (n = 92) einzeln betrachtete.

Durch die Hinzunahme der durchschnittlichen Signalzahl von LSI 17.2 werden mehr Tumoren als zuvor als HER-2/neu-positiv interpretiert und für eine Therapie mit Trastuzumab, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, zugänglich. Auf das Überleben ergab sich für die metastasierten Patienten, die allesamt nach dem Ergebnis der konventionellen Interpretation nach dem Signalquotienten palliativ therapiert wurden, jedoch kein signifikanter Effekt.

Abstract

Determining the HER2 status is a prerequisite for the decision to use Trastuzumab or not in adjuvant treatment of malignant tumors. Corresponding FISH assays are based on a comparative analysis of chromosomal probes' LSI 17.2 (HER-2/neu-region on chromosome 17) and CEP 17 (centromeric region of chromosome 17) signals. In 2013 ASCO recommended a modification for human epidermal growth factor receptor 2 testing based on experiences with histologically analyzed tumor tissues. In addition to the signal ratio [LSI 17.2 / CEP 17], the average number of signals for LSI 17.2 was counted as a second criterion, so that two evaluation algorithms are used in parallel. Up to now, there is a lack of experience with cytological material.

In our retrospective clinical investigation of 106 cytological cases, which were already examined for their HER-2 / neu status in routine diagnostics between 2007 and 2014, the new evaluation algorithm was subsequently applied and methodologically and clinically analyzed.

The cytological tumor specimens were extracted from 96 women and 10 men (mean age of patients: 64 year) with metastatic carcinomas, including 84 effusion carcinosis, 8 liver metastases, 7 LK-metastases and 7 others. Primary tumors were available from 92 of the patients with breast cancer, 11 with gastric cancer and 3 others. Clinical follow-up was determined in cooperation with the clinics that sent the samples and was available for 99 out of 106 cases.

FISH analyses were performed according to the standard operation procedures with focus on cytopathology. The average number of evaluated tumor cells was 32. The number of LSI 17.2 and CEP 17 signals were documented cell by cell. A signal quotient ≥ 2 or an average LSI 17.2 signal number ≥ 6 were considered as positive.

Out of 106 specimens, 65 (61.3%) were negative and 22 (20.8%) were positive using both evaluation methods. Based on the signal ratio, 8 cases were positive (7,5%), 11 cases (10,4%) were positive based on signal enumeration while concordance was 82.1%. Considering breast cancer as the most common tumor group individually (n=92), similar values were obtained.

Inclusion of the average number of signals from LSI 17.2 leads to a higher number of tumor cases counted as Her-2/neu positive which are open to therapy with Trastuzumab, a tyrosine kinase inhibitor. There was no significant effect on the survival rate in the case of patients suffering from metastatic tumors who were all treated palliatively according to the result of the conventional interpretation according to the signal ratio.

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil, Zytostatikum
Abb.	Abbildung
ABC	<i>Advanced Breast Cancer</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
Asperi	Bezeichnung der gemeinsamen Gruppe für die Fälle mit Aszites bzw. Perikarderguss
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlich-Medizinischer Fachgesellschaften
BMDP	Department of Biomathematics der University of California, Los Angeles, USA
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BRCA1-Gen	Breast Cancer Gen 1
BRCA2-Gen	Breast Cancer Gen 2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CEP 17	Zentromer-nahe Abschnitte des Chromosoms 17
CISH	<i>chromogene in situ-hybridization</i>
COIP	<i>Coordinating Office for International Patients</i> am Universitätsklinikum Düsseldorf
CUP	<i>Cancer of Unknown Primary</i>
DAKO-Score	Nach der Firma Dako in Kopenhagen benannter immunhistochemischer Auswertescore für Her2-neu
DAPI	DNA-Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol
DGHO	Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>

EGTM	<i>European Group on Tumor Markers</i>
ER	Östrogen-Rezeptor
Erb-B2	Zelloberflächenrezeptor, Onkogen
Erb-B3	ein Tyrosin-Protein-Kinase-Rezeptor, auch als HER-3 bezeichnet
Erb-B4	ein Tyrosin-Protein-Kinase-Rezeptor
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Alternativhypothese
H.p.	<i>Helicobacter pylori</i>
HDGC-Syndrom	<i>Hereditary diffuse gastric cancer</i> -Syndrom
HER1	EGFR, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HER2	ErbB-2, neu
HER-2/neu	Bezeichnung sowohl für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, als auch für sein zugehöriges Gen auf Chromosom 17
HER3	ErbB-3
HER4	ErbB-4
HNPCC-Syndrom	<i>Hereditary non polypous colon cancer</i> -Syndrom
IHC	Immunhistochemie
Inc.	Incorporated
ISH	In-situ-Hybridisierung
kB	Maßeinheit für Kilobasen
Ki-67	Immunhistochemischer Proliferationsmarker
LK	Lymphknoten
LCRAT	Abkürzung einer Auswertungsvariablen für die HER-2/neu-Diagnostik

LSI 17.2	Sonde zur Markierung der chromosomalen Region 17q11.2-q12
LZRAT	Abkürzung einer Auswertungsvariablen für die HER-2/neu-Diagnostik
MEDICO	Patientendokumentationssystem des Universitätsklinikums Düsseldorf
mittl.	mittleres
Mon.	Monate
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Networks</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NST	<i>no special type</i> , aktuelle Typisierung der früher als invasiv-duktral klassifizierten Mammakarzinome
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
S3	Definiertes Qualitätsmerkmal einer Leitlinie der AWMF (Stufen: S1, S2k, S2e, S3)
SD	Standardabweichung
SISH	<i>Silver-in-situ-hybridization</i>
SOP	<i>standard operation procedures</i>
Tab.	Tabelle
TNM-Klassifikation	Kategorisierungssystem maligner Tumoren zu Primärtumor (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen (M)
ToGA	Akronym der Studie " <i>Trastuzumab for Gastric Cancer</i> "
u.a.	unter anderem
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
ÜL	Überleben

ÜLW	Überlebenswahrscheinlichkeit
USCF	<i>University of California San Francisco</i>
UWMC	<i>University of Washington Medical Center</i>
vgl.	vergleiche
W	Maßeinheit für Watt
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	-fach; z.B. 40-fache Vergrößerung (40x)
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Epidemiologische und klinische Grundlagen des Mammakarzinom	2
1.2	Epidemiologische und klinische Grundlagen des Magenkarzinoms	6
1.3	Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER-2/neu)	11
1.3.1	Bestimmung des HER-2/neu-Status durch Immunhistochemie und Immunzytochemie	12
1.3.2	Bestimmung des HER-2/neu-Status durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	15
1.3.3	Synoptische Darstellung der klassischen HER-2/neu-Bestimmung im klinischen Alltag	16
1.3.4	Leitlinien-akzeptierte Modifikation der Auswertung der FISH-basierten HER-2/neu-Bestimmung	18
1.4	Problemstellung	20
2.	Material und Methoden	22
2.1	Patientenkollektiv	22
2.2	Aufarbeitung des eingesandten Materials und konventionelle zytologische Routinediagnostik	23
2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	24
2.3.1	Prinzip der Untersuchungsmethode	24
2.3.2	Hybridisierungssonden	25
2.3.3	Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	26
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hybridisierten Präparate	26
2.4	Datensatz für die methodischen und klinischen Auswertungen	30
2.5	Statistische Untersuchungen	31

3.	Ergebnisse	33
3.1	Methodischer Vergleich der HER-2/neu-Auswertungen	33
3.2	Univariate Überlebensanalyse für das gesamte Patientenkollektiv	35
3.2.1	Allgemeine klinische Daten	35
3.2.2	Geschlecht der Patienten	36
3.2.3	Alter der Patienten	37
3.2.4	Entnahmelokalisation	38
3.2.5	Tumorentität des Primärtumors	41
3.2.6	HER-2-neu-Status (Quotienten-bezogene klassische Auswertung)	42
3.2.7	HER-2-neu-Status (Signal-bezogene modifizierte Auswertung)	43
3.2.8	HER-2-neu-Status (Auswertung gemäß ASCO)	44
3.3	Univariate Überlebensanalyse für die Gruppe der Mammakarzinome	45
3.3.1	Alter der Patienten	45
3.3.2	Entnahmelokalisation	46
3.3.3	HER-2-neu-Status (Quotienten-bezogene klassische Auswertung)	48
3.3.4	HER-2-neu-Status (Signal-bezogene modifizierte Auswertung)	50
3.3.5	HER-2-neu-Status (Auswertung gemäß ASCO)	52
4.	Diskussion	54
4.1	Indikationen zur Bestimmung des HER-2/neu-Status an Metastasen	55
4.2	Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Komplementäre Verfahren in der HER-2/neu-Diagnostik	56
4.3	Histologie und Zytologie: Komplementäre Materialien für die HER-2/ neu-Analyse	62
4.4	ASCO-basierte Modifikation des HER-2/neu-Auswertealgorithmus: Ein inzwischen allgemein anerkanntes Auswerteverfahren	67
4.5	ASCO-basierte Modifikation des HER-2/neu-Auswertealgorithmus: Eigene Daten und klinische Implikationen	70
4.6	HER-2/neu-Diagnostik: Ausblick	72
5	Literatur	75

1. Einleitung

Die Einbeziehung von monoklonalen Antikörpern aus der Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren in die neoadjuvante und die adjuvante Behandlung von Tumorerkrankungen ist zu einem wichtigen Standbein der onkologischen Therapien geworden. Hierzu stehen für diverse Tumorentitäten Therapeutika zur Verfügung, deren Applikation aber an Voraussetzungen gebunden ist und die nicht für jede individuelle Tumorerkrankung geeignet sind. Vielmehr muss zuvor durch Testungen am Tumorgewebe herausgefunden werden, ob eine Beeinflussung des klinischen Verlaufes durch solche Therapeutika zu erwarten ist oder nicht.

Ein wichtiger Ansatz ist dabei die therapeutische Verwendung des Antikörpers Trastuzumab für den Fall einer Amplifikation des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors 2 (HER-2/neu), die bei Mammakarzinomen und Magenkarzinomen in Betracht kommt und dort in die aktuellen S3-Leitlinien aufgenommen ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2019a und 2019b¹). Zur Bestimmung stehen dabei die Immunhistochemie und das molekulare Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit einer unten erläuterten aktuellen Modifikation der HER-2/neu-Auswertung von im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten FISH-basierten Amplifikationsuntersuchungen. Die modifizierte Auswertung wurde im Vergleich mit dem bisherigen Auswertungsverfahren retrospektiv auf ein Patientenkollektiv angewandt, welches überwiegend aus Patienten mit Mamma- bzw. mit Magenkarzinomen besteht.

Deswegen sollen im Folgenden zunächst diese beiden Tumorentitäten vorgestellt werden.

¹ Diese beiden Quellen werden im Folgenden kurz als "S3 Mamma 2019" bzw. "S3 Magen 2019" zitiert.

1.1 Epidemiologische und klinische Grundlagen des Mammakarzinoms

Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr der häufigste bösartige Tumor der Frau, fast eine halbe Million Frauen sterben jährlich daran (Schrodi et al. 2017). Er ist für knapp 30% aller Malignom-Neuerkrankungen verantwortlich. Die allgemeinen Trends für das Mammakarzinom der Frau sind in der Krebsstatistik in Deutschland seit Jahren etwa konstant. Im Folgenden wird, falls nicht im Einzelfall anders angegeben, konkret auf die Zahlen von 2014 Bezug genommen, die in der aktualisierten 11. Auflage der Zusammenstellung "Krebs in Deutschland für 2013/2014" veröffentlicht wurden (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2017)².

Pro Jahr erkranken in der Bundesrepublik Deutschland knapp 70.000 Frauen neu an einem Mammakarzinom. Damit stellt diese Tumorart 30,5% aller maligner Tumoren bei Frauen dar und nimmt mit weitem Abstand vor dem kolorektalen Karzinom (12,3%) und dem Bronchialkarzinom (8,5%) Platz 1 in der Statistik der Krebsneuerkrankungen ein. Die 5-Jahres-Prävalenz beträgt 311.400 Fälle. Das Risiko einer Frau, im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei über 12%, so dass letztendlich jede 8. Frau daran erkranken wird. Die Mortalität ist seit den 90er Jahren aufgrund verbesserter Früherkennung und Fortschritten in der adjuvant systemischen Therapie rückläufig (Schrodi et al. 2017), die Inzidenz hingegen ist seit 1980 stetig steigend. Das mittlere Erkrankungsalter für ein Mammakarzinom in Deutschland liegt bei ca. 64 Jahren, was unterhalb des mittleren Erkrankungsalters für alle Krebsarten liegt, welches bei Frauen 69 Jahre beträgt. Ungefähr 30% der Betroffenen sind dabei unter 55 Jahre alt.

2014 starben in Deutschland 17.670 Frauen an einem Mammakarzinom. Insgesamt liegt die Sterblichkeit bei 17,4% aller Krebserkrankungen und nimmt

² Diese Quelle wird im Folgenden kurz als "RKI 2017" zitiert.

dort noch vor dem Bronchialkarzinom (15,3%) und dem kolorektalen Karzinom (11,7%) den 1. Platz ein. Dennoch ist insgesamt gesehen das Mammakarzinom ein maligner Tumor mit eigentlich günstiger Gesamtprognose und steht bei Frauen bezogen auf das relative 5-Jahres- bzw. relative 10-Jahres-Überleben mit Werten von 88% bzw. 82% auf Platz 3 nach dem malignen Melanom und dem Schilddrüsenkarzinom. Dass es besonders gefürchtet ist, hat sicher mit seiner Häufigkeit, aber auch mit der Tatsache zu tun, dass nicht selten auch jüngere Patientinnen daran versterben; bei Frauen zwischen 35 und 60 Jahren ist es für 29% aller Krebstodesfälle in dieser Altersklasse verantwortlich.

Das Mammakarzinom beim Mann kann vergleichsweise kurz abgehandelt werden, da es mit 650 neu auftretenden Fällen pro Jahr selten ist; es stellt in der Tumorstatistik der Männer in Deutschland nur 0,26% aller Erkrankungsfälle dar. Auch wenn Diagnostik und Therapie dem Mammakarzinom bei Frauen sehr ähnlich sind (Stadler et al. 2017, S3 Mamma 2019), wird die Diagnose oft erst eher spät gestellt, wodurch sich eine im Vergleich zu den Frauen schlechtere Gesamtprognose begründet (Stadler et al. 2017, RKI 2017); die relative 5-Jahres- bzw. relative 10-Jahres-Überlebensrate werden mit 73% bzw. 69% angegeben.

Legt man die relativen 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten aller malignen Tumoren zugrunde, die bei Frauen 65% bzw. 60% und bei Männern 59% bzw. 55% betragen, so verfügt das Mammakarzinom bei beiden Geschlechtern über eine klar überdurchschnittliche Prognose.

Risikofaktoren

Die wesentlichen Risikofaktoren lassen sich nach Maurer et al. (2017) wie folgt zusammenfassen: Die meisten Fälle von Mammakarzinomen der Frau treten sporadisch, d.h. ohne eine ätiologisch fassbare Ursache auf, obwohl genetische Risiken bekannt sind. Veränderungen im BRCA1- bzw. BRCA2-Gen, bei denen vermehrt Karzinome der Mamma und der Ovarien vorkommen, liegen in nur 5-10% der Tumoren zugrunde. Indirekt reflektiert auch die Tatsache, dass eine

positive familiäre Krebsanamnese häufiger gefunden wird, weitere genetische Risiken, die aber offenbar noch nicht genau identifiziert sind.

Einen wichtigen Faktor stellen hormonelle Einflüsse dar. Eine hohe Anzahl von Menstruationszyklen im Laufe des Lebens (frühe Menarche, späte Menopause), Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt wirken sich risikoe erhöhend aus. Eine längere Stillzeit nach Geburten wiederum wird als risikovermindernd angesehen. Eine Hormonersatztherapie in und nach den Wechseljahren, insbesondere mit einer Kombination aus Östrogenen und Gestagenen, steigern das Risiko. Orale Kontrazeptiva beeinflussen die Erkrankungswahrscheinlichkeit hingegen nur gering. Letztendlich scheint es so zu sein, dass längere Gestagen-betonte Phasen (z.B. Schwangerschaft, Stillzeit, kürzeres Menstruationsleben), welche die ansonsten Östrogen-betonten Phasen des Zyklus unterbrechen, eine Verminderung des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken, bedeuten.

Von solchen Hormoneinflüssen abgesehen werden auch eine zurückliegende Thoraxbestrahlung, Alkohol- und Nikotinabusus, ein Typ II Diabetes mellitus, ein erhöhter *Body Mass Index* (BMI), fettreichere Ernährung, verminderte körperliche Aktivität und Schlafmangel mit erhöhten Brustkrebsrisiken in Verbindung gebracht.

Bei den Männern (Stadler et al. 2017) sind überdurchschnittlich häufig Patienten mit Leberzirrhose oder mit Hormonbehandlung mit weiblichen Geschlechtshormonen (z. B. bei höheren Stadien des Prostatakarzinoms) betroffen, also Patienten, die Östrogen-artige Verbindungen nicht regulär verstoffwechseln können oder exogen erhalten - letztendlich handelt es sich dabei um den gleichen Mechanismus, der auch bei Frauen das Auftreten eines Mammakarzinoms begünstigt.

Grundzüge von Klinik und Therapie

Die klinischen Ausdrucksformen von Mammakarzinomen sind breit gefächert, gehen aber meistens mit einer umschriebenen Konsistenzvermehrung ("Tast-

befund") bzw. Formveränderungen der Mamma wie Einziehungen, Mamillen-retraktion etc. einher. Andere Patientinnen tasten als erstes Lymphknoten-vergrößerungen in der Axilla. Wiederum andere Fälle werden im Rahmen der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen bzw. durch bildgebende Untersuchungen aufgedeckt, z.B. durch das Mammographie-Screening.

Die Diagnosesicherung erfolgt heute in annähernd allen Fällen durch eine stanziobiotische Gewebsentnahme, wobei im Rahmen der Tumorsicherung auch der Hormonrezeptorstatus für Östrogen (ER) und Progesteron (PR), die Ki-67-Proliferationsrate und der HER-2/neu-Status erhoben werden.

Die aktuelle S3-Leitlinie zum Mammakarzinom (2019) gibt abhängig vom durch entsprechende klinisch-bildgebende Maßnahmen zu bestimmenden Tumorstadium auch therapeutische Vorgaben wieder, die in der großen Mehrzahl der Fälle eine operative Entfernung des Mammakarzinoms durch brusterhaltende Therapie, entweder primär oder nach neoadjuvanter Chemotherapie, umfassen, ferner die Entfernung wenigstens der Sentinel-Lymphknoten, oft später gefolgt von Strahlentherapie des Restdrüsenkörpers und / oder weiterer Chemotherapie. Details sollen hier nicht weiter ausgeführt werden; allerdings soll auf das Kapitel 4.7.5 mit dem Titel "Antikörpertherapie" Bezug genommen werden, in welchem in der S3-Leitlinie die Indikationen für eine Trastuzumab-Therapie niedergelegt sind. Diese ist methodisch an einen positiven Nachweis von HER-2/neu gebunden, um welchen es in unserer Studie geht. Klinisch kommen verschiedene Patientengruppen sowohl für eine neoadjuvante Therapie oder für eine adjuvante Therapie, jeweils in Kombination mit speziellen Chemotherapeutika, in Frage, wobei eine Applikationsdauer von einem Jahr vorgegeben wird.

Prognosefaktoren

Die wichtigsten Prognosefaktoren der Mammakarzinome werden im Rahmen der Aufarbeitung des Resektatmaterials in der Pathologie ermittelt.

Zu ihnen gehören insbesondere die Tumorgöße und der Lymphknotenstatus gemäß den Vorgaben der TNM-Klassifikation. Dies belegen beispielsweise die

aktuellen Zahlen des Tumorzentrums München für 41.688 Patientinnen, die zwischen 1998 und 2016 dort mit einem Mammakarzinom registriert wurden (Tumorregister München 2018b). Für primär nicht metastasierte Patientinnen (M0) betrug das 10-Jahres-Überleben im Stadium T1N0 86,8%, im Stadium T2N0 72,6%, im Stadium T3/T4N0 50,2%, im Stadium T1N+ 76,3%, im Stadium T2N+ 58,3% und im Stadium T3/T4N+ 35,7%. Für primär metastasierte Patientinnen (M1) lag es bei 10,1%.

Eine prognostische Bedeutung haben außerdem (S3 Mamma 2019) die histologische Tumordifferenzierung und die Ergebnisse der oben genannten vier Sonderuntersuchungen zu ER, PR, Ki-67 und HER-2/neu. Unter bestimmten Bedingungen kann auch eine genetische Testung des Tumormaterials, z.B. mit dem *Oncotype*- oder dem *Endopredict*-Test, in Betracht kommen. Klinisch-bildgebend kommen Informationen zu eventuellen Fernmetastasen hinzu. Die Unterscheidung zwischen den beiden häufigsten, zusammen > 90% ausmachenden Tumortypen der WHO-Klassifikation, nämlich des invasiv-duktales (neu: *no special type*, NST) und des invasiv-lobulären Karzinoms, gilt stadienbereinigt als prognostisch nicht entscheidend. Die seltenen Sonderformen (z.B. tubuläres, apokrines oder muzinöses Karzinom) werden als prognostisch günstig angesehen.

Problematisch beim Mammakarzinom ist, dass oft schon frühzeitig eine okkulte hämatogene Metastasierung vorliegt. Die disseminierten Tumorzellen verbleiben oft in einem Ruhezustand (Pantel et al. 1993), der dann als Spätmetastasierung enden kann. Dabei kommen immer wieder auch Fälle vor, bei denen solche Spätmetastasen erst 10 oder gar 15 Jahre nach primärer Tumordiagnose auftreten.

1.2 Epidemiologische und klinische Grundlagen des Magenkarzinoms

Epidemiologie

In Deutschland erkrankten, den aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Institutes folgend (RKI 2017), die auch Grundlage der im weiteren Text genannten Zahlen

sind, jährlich ca. 15.000 Personen am Magenkarzinom, wobei Männer häufiger betroffen sind. Auf sie entfielen 2014 9.340 Fälle, auf Frauen 6.090. Das Magenkarzinom stellt bei Männern die siebthäufigste und bei Frauen die neunthäufigste Tumorerkrankung dar. Aus der Statistik des Jahres 2014 geht hervor, dass das mittlere Erkrankungsalter für Männer 72 Jahre und für Frauen 75 Jahre beträgt.

Die Mortalitätsstatistik zeigte 5.545 Sterbefälle bei Männern und 4.065 Fälle bei den Frauen. Damit liegt das Magenkarzinom bezüglich tumorbedingter Todesursachen an fünfter Stelle bei den Männern und an sechster Stelle bei den Frauen und stellt bei Männern 4,6% der Krebstodesfälle, bei Frauen 4,0%.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 30% für Männer und 33% für Frauen, die entsprechenden Werte für die relative 10-Jahres-Überlebensrate liegen bei 28% bzw. 29%. Die Überlebensaussichten mit Magenkrebs haben sich zwar in den letzten Jahren verbessert, sind jedoch im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen weiterhin sehr ungünstig. Bezogen auf die oben beim Mammakarzinom genannten relativen 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten aller malignen Tumoren von bei Frauen 65% bzw. 60% und bei Männern 59% bzw. 55% sind die des Magenkarzinoms jeweils fast genau nur halb so hoch. Insgesamt ist die Prognose des Magenkarzinoms allerdings besser als die der übrigen Karzinome des oberen Gastrointestinaltraktes (Ösophagus, Pankreas, Gallenwege, Leber).

Die schlechte Prognose hat insbesondere damit zu tun, dass nur ca. ein Drittel der Fälle in den früheren Stadien T1N0 und T2N0 diagnostiziert werden, ca. zwei Drittel hingegen in späten Stadien mit Lymphknoten- oder Fernmetastasierung bzw. hohem Risiko zum Abtropfen von Tumorzellen in die freie Bauchhöhle mit Entwicklung einer Peritonealkarzinose.

Risikofaktoren

Insgesamt ist schon seit ca. 1930 weltweit eine sinkende Inzidenz bei beiden Geschlechtern zu verzeichnen; hierdurch unterscheidet sich das Magenkarzinom von praktisch allen anderen Krebsarten, deren Inzidenz seit langem steigt. So

sank sie in der EU zwischen 1980 und 1999 um 45% (Siveke et al. 2013). Von 2011 mit 9.800 Neuerkrankungen bei Männern und 6.640 Neuerkrankungen bei Frauen ausgehend wurde für das Jahr 2016 mit einem weiteren Rückgang der Erkrankungsfälle auf 9.200 bzw. 6.400 gerechnet (RKI 2017); die konkreten Zahlen liegen aber noch nicht in veröffentlichter Form vor.

Gründe für den Rückgang der Tumorinzidenz liegen insbesondere in der sinkenden Prävalenz der Infektion mit *Helicobacter pylori* (H.p.), einem Bakterium, das Auslöser der Typ B-Gastritis ist und als Hauptpräkanzerose des Magenkarzinoms angesehen wird; den Rückgang der H.p.-Durchseuchung und damit den spontanen Rückgang der H.p.-assoziierten Gastritisfälle erklärt man sich u.a. mit der verbesserten Konservierung und Kühlung von Lebensmitteln und durch die bessere Ernährungslage (Siveke et al. 2013). Wird H.p. bei Betroffenen medikamentös eradiziert, so können die meisten Patienten als auf Dauer geheilt angesehen werden; die Re-Infektionsquote pro Jahr wird auf nur ca. 2% in Industrieländern geschätzt (Yan et al. 2013).

Als weitere wesentliche, allerdings seltene präkanzeröse Erkrankung ist die chronisch-atrophe Typ A-Gastritis zu nennen, die als Autoimmunerkrankung gilt. Besondere Beachtung verdient ferner, dass noch Jahrzehnte nach Magenteilresektionen, insbesondere nach einer Billroth II-Operation, Magenstumpfkarcinome auftreten können. Ihre Entstehung wird auf die durch Gallereflux begünstigte umfangreiche Ausbreitung einer intestinalen Metaplasie aus dem Anastomosenbereich in den Magenstumpf gesehen. Für Patienten mit Billroth II-Operation gilt das Magenkarzinomrisiko als bis zu 8,6-fach erhöht (Siveke et al. 2013). Genetische Risikofaktoren sind nach Forman und Burley (2006) unter anderem ein HNPCC-Syndrom, ein HDGC-Syndrom und ein Peutz-Jeghers-Syndrom, ferner an erworbenen Erkrankungen ein Morbus Ménétrier.

Letztendlich muss allerdings die Entstehung des Magenkarzinoms im Einzelfall als multifaktorieller Prozess angesehen werden, zu dem erworbene und hereditäre genetische Faktoren gemeinsam beitragen können.

Grundzüge von Klinik und Therapie

Klinisch können bei Magenkarzinomen ganz verschiedene Symptome auftreten, abhängig von ihrem Sitz im Magen und ihrem Verhalten gegenüber der Schleimhautoberfläche. Wenn sie in Engen auftreten, also im gastro-ösophagealen Übergang bzw. der Kardia oder im präpylorischen Antrum, fallen sie oft schneller durch Völlegefühl oder andere Folgen der Passagestörung auf. Magenkarzinome, die ulzeriert sind, können über jedes Symptom verfügen, das man auch von biologisch benignen Ulzera ("Magengeschwür") kennt. Insbesondere wären hier Schmerzen, Übelkeit und Inappetenz zu nennen. Andere Karzinome wiederum, die beispielsweise an der großen Kurvatur wachsen und sich eher oberflächlich-unterminierend verbreiten, können lange symptomfrei sein. Fortgeschrittene Fälle manifestieren sich nicht selten erst durch allgemeine Spätsymptome wie eine B-Symptomatik oder Aszitesbildung im Rahmen einer Peritonealkarzinose.

Die kurativ intendierte Therapie der meisten Magenkarzinome fußt auf der totalen Gastrektomie mit Lymphadenektomie; bei tief antralem Tumorsitz ist auch eine subtotale Gastrektomie möglich. Bei Sitz des Tumors im proximalen Drittel wird eine erweiterte Gastrektomie unter Einbeziehung des distalen Ösophagus angestrebt. Diese sehr radikal erscheinende Strategie geht zum einen auf anatomische Notwendigkeiten zurück, die auf der Gefäßversorgung des Magens basieren, zum anderen aber auch auf die Tatsache, dass Magenkarzinome oft kleinherdig unterminierend noch relativ weit von der eigentlichen klinischen Tumorbildung entfernt in den tieferen Magenwandschichten nachweisbar sind, was einen hohen Abstand der Resektionsränder zur Erreichung einer R0-Resektion erfordert. So wird beispielsweise bezüglich der Indikationsstellung für eine subtotale Gastrektomie in der aktuellen deutschen Leitlinie für das Magenkarzinom, veröffentlicht von der DGHO, der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO 2018), explizit ausgeführt, dass *"eine subtotale Gastrektomie [nur durchgeführt werden kann], wenn eine proximale Tumorfreiheit zwischen dem Oberrand des Tumors und dem ösophago-gastralen Übergang von mindestens 5 cm erreicht werden kann. Bei Karzinomen vom diffusen Typ wird ein Sicherheitsabstand von 8 cm empfohlen."*

Endoskopische Therapieverfahren sind intramukosalen Frühkarzinomen (Stadium IA, pT1a) vorbehalten (S3 Magen 2019), wohingegen gemäß der DGHO-Leitlinie Patienten mit einem submukosalen Frühkarzinom (Stadium IA, pT1b) bereits primär eine operative Therapie empfohlen wird. Im Stadium II bzw. III soll eine neoadjuvante Chemotherapie der Operation vorangestellt werden, gefolgt dann später von einer weiteren adjuvanten Chemotherapie. In der palliativen Situation des Stadium IV kommen dann medikamentöse Verfahren zum Einsatz, die in Abhängigkeit von einem positiven HER-2/neu-Status auch die Trastuzumab-Therapie einschließen. Diese Patienten, die einen Anteil von ca. 10-15% der Patienten stellen, profitieren gemäß den Ergebnissen der ToGA-Studie (Bang et al. 2010) in Kombination mit einer palliativen Chemotherapie mit Capecitabin oder 5-FU und Cisplatin von einer solchen Therapie und verfügen über ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben, auch wenn es in der metastasierten Situation letztendlich nur um einen Gewinn von einigen Monaten geht.

Prognosefaktoren

Wichtigster Prognosefaktor des Magenkarzinoms ist das Stadium bei Diagnosestellung. Dies zeigen die Zahlen des Tumorzentrums München für 6.761 Patienten, die zwischen 1998 und 2016 in seinem Zuständigkeitsgebiet an Magenkarzinomen erkrankten (Tumorregister München 2018a). Das 5-Jahres-Überleben betrug im Stadium IA 76,5%, im Stadium IB 59,9%, im Stadium II 36,6%, im Stadium IIIA 18,9% und im Stadium IV 5,2%.

Inwieweit andere Faktoren wirklich die Prognose unabhängig davon beeinflussen, ist umstritten. So wird beispielsweise der Allgemeinzustand des Patienten als ein solcher Faktor genannt, wobei er aber insbesondere bei den häufigen stenosierenden Tumoren am Mageneingang oder -ausgang vom Tumorstadium beeinflusst wird. Von den histologischen Typen nach Laurén, bei denen intestinale, diffuse und Siegelringkarzinome sowie Mischformen unterschieden werden, verlaufen letztere zwar durchschnittlich schlechter als die übrigen beiden

Formen, gehen aber auch häufiger mit einem höheren Tumorstadium bei Diagnosestellung einher.

1.3 Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER-2/neu)

Im folgenden Abschnitt sollen die grundlegenden Eigenschaften von HER-2/neu charakterisiert werden.

HER-2/neu ist ein Wachstumsfaktorrezeptor, der zur HER-Familie gehört. Insgesamt besteht diese aus vier Genen, die für vier verwandte Tyrosinkinase-Rezeptoren kodieren: HER-1 (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), HER-2 (ErbB-2, neu), HER-3 (ErbB-3) und HER4- (ErbB-4).

Die vier Proteine werden in vielen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert und spielen eine fundamentale Rolle während derer Entwicklung (Graus-Porta et al. 1997, Gassmann et al., 1995, Lee et al. 1995, Sibilio und Wagner 1995, Threadgill et al. 1995). In der Onkologie ist das Interesse an ihnen hoch, da einige von ihnen in die Karzinomentstehung involviert sind (Graus-Porta et al. 1997, Gassmann et al. 1995, Lee et al. 1995).

Die vier Rezeptoren sind jeweils Transmembranrezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität und ähnlicher Struktur. HER-1, HER-3 und HER-4 verfügen über mehrere bekannte Liganden. Binden diese an die passende Domäne, so werden Dimere ausgebildet. HER-2 unterscheidet sich hingegen darin, dass es keinen bekannten Liganden aufweist, sondern Homo-Dimere ausgebildet werden, sobald eine Überexpression des Gens vorliegt. Je nachdem, ob HER-Rezeptoren mit gleichartigen oder unterschiedlichen Mitgliedern der HER-Familie eine Bindung eingehen, werden entweder Homo- oder Hetero-dimere ausgebildet, wobei bevorzugt HER2 gebunden wird (Graus-Porta et al. 1997, zusammengefasst bei Christians 2007).

Die Regulation der HER-2-Rezeptorfunktion ist komplex, da zahlreiche Liganden bekannt sind. Bei der Bindung mit der extrazellulären Domäne des ent-

sprechenden Rezeptors, kommt es eben nicht nur zu Rezeptorhomodimeren, sondern auch zu Heterodimeren. Folglich induzieren alle von ihnen die Tyrosinphosphorylierung dadurch, dass es u.a. zur Auslösung der Heterodimerisierung kommt, obwohl aber keiner der Liganden direkt an HER-2 bindet. Anzunehmen ist, dass HER-2 als ein Rezeptor fungiert, der eine Art Teiluntereinheit aller anderen HER-Rezeptoren ist (King et al. 1988, Plowman et al. 1993, Sliwkowski et al. 1994, Beerli and Hynes 1996). Allerdings gibt es auch Beobachtungen, die dieses Modell in Frage stellen. Aus der Dimerisierung resultiert die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne, was zur Übermittlung eines Wachstumssignal an den Zellkern und schließlich zum Tumorwachstum führt, wobei der apoptotische Zelltod verhindert wird (Witton et al. 2003).

Das HER-2/neu-Gen ist lokalisiert auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q12–21.32) und kodiert für einen epithelialen Wachstumsfaktorrezeptor an der Zellmembran. Eine Überexpression des HER-2-Proteins folgt letztendlich der Zahl der Genkopien. Diese kann zum einen erhöht sein durch Amplifikation des HER-2-Gens oder durch eine vermehrte Kopienzahl des Chromosoms 17 (Polysomie). Prinzipiell wäre auch eine Kombination beider Effekte vorstellbar.

Die Bestimmung des HER-2/neu-Status ist mit der unten besprochenen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder mit anderen Techniken der in-situ-Hybridisierung möglich. Als in vielen Fällen äquivalente und in der Routinediagnostik oft vorgezogene Methode stehen die Verfahren der Immunhistochemie bzw. Immunzytochemie zur Verfügung.

1.3.1 Bestimmung des HER-2/neu-Status durch Immunhistochemie und Immunzytochemie

Allgemeines zur HER-2/neu-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgt an einem repräsentativen histologischen Schnittpräparat und besteht aus einer später über eine Farbindikatorreaktion sichtbar gemachten, standardisierten Antigen-Antikörper-Reaktion, welche am Lichtmikroskop mit dem international anerkannten DAKO-Score semi-

quantitativ ausgewertet wird. Beurteilt werden dabei die Art und das Ausmaß der Bindung des Primärantikörpers an der Zellmembran der Tumorzellen, wobei nur invasive Tumoranteile ausgewertet werden dürfen.

Zusammengefasst nach Mayr et al. (2017) erfolgt die Interpretation des DAKO-Scores als 0, 1+, 2+ oder 3+. Ein immunhistochemischer Score von 0 (keine Färbereaktion oder $\leq 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran) oder von 1+ ($>10\%$ der invasiven Tumorzellen mit schwacher Markierung der Zellmembran) wird als Nachweis einer fehlenden Genamplifikation angesehen und als "negativ" interpretiert. Ein Score von 3+ ($> 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran; Färbeintensität stark) hingegen wird als "positiv" beurteilt und gilt allgemein als Äquivalent für den Nachweis einer therapeutisch relevanten Genamplifikation des HER-2-Gens. Ein Beispiel für eine immunhistochemische Färbung mit einem Score von 3+ ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

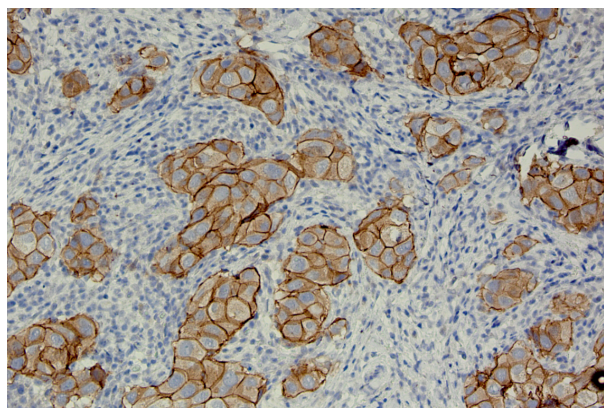


Abb. 1: Beispiel für ein immunhistochemisch HER-2/neu-positives Adenokarzinom (Score 3+). Objektivvergrößerung 20x

Insgesamt kann man sagen, dass der DAKO-Score so „eingestellt“ sein soll, dass in den Kategorien 0 und 1+ kaum falsch-negative Fälle und in der Kategorie 3+ kaum falsch-positive Fälle auftreten und die methodisch einfachere immunhistochemische Bestimmung in diesen drei Kategorien als Äquivalent für den molekulargenetischen Ansatz verwendet wird; dieses Vorgehen soll nicht hier, sondern in der Diskussion kritisch hinterfragt werden.

Bei bis zu 15% der Fälle wird hingegen ein Score von 2+ (>10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran, Färbeintensität gering bis mittelgradig bzw. starke Markierung der Zellmembran in <10%) erhoben, der nicht ausreicht, um mit der Immunhistochemie ausreichend sicher auf eine HER-2-Genamplifikation rückzuschließen. In dieser Gruppe kommen sowohl eine Reihe von Fällen mit Genamplifikation vor als auch eine Reihe von Fällen, die keine aufweisen, so dass letztlich keine eindeutige Therapieentscheidung auf rein immunhistochemisch basierter Diagnostik getroffen werden kann. In dieser Situation wird dann eine ergänzende FISH-Untersuchung oder ein verwandtes Verfahren (SISH, CISH) angeschlossen. In ungefähr 25-30% der Fälle mit einem DAKO-Score 2+ kann auf diese Weise eine Genamplifikation nachgewiesen werden (siehe z.B. die Meta-Analyse von Bahreini et al. 2014); siehe hierzu auch Kapitel 4.2 in der Diskussion.

Besonderheiten der HER-2/neu-Immunhistochemie beim Mammakarzinom

Bei Mammakarzinomen erfolgt die Auswertung von Tumorzellen als positiv ausschließlich unter Bezugnahme auf eine Färbung der gesamten Zellmembran. Zellen, die nur eine partielle Membranfärbung aufweisen, werden nicht gewertet. Außerdem gilt die HER-2/neu-Färbung bei Mammakarzinomen als in den meisten Fällen weitgehend homogen, so dass ein Rückschluss von prä-operativen Stanzbiopsien auf den Gesamttumor allgemein akzeptiert ist.

Besonderheiten der HER-2/neu-Immunhistochemie beim Magenkarzinom

Im Vergleich zum Mammakarzinom werden beim Magenkarzinom bei der Auswertung auch Zellen, bei denen nur eine inkomplette Membranfärbung vorliegt, berücksichtigt und dann nach ihrer semiquantitativ geschätzten Intensität als 1+, 2+ oder 3+ eingestuft. Außerdem ist die HER-2/neu-Färbung bei Magenkarzinomen wesentlich häufiger heterogen als bei Mammakarzinomen, was die Auswertung von Biopsien in ihrer Wertigkeit mindern könnte. Schließlich ist bei Magenresektaten darauf zu achten, dass mindestens 10% der Tumorzellen eine Membranfärbung der entsprechenden Intensität aufweisen. Genaue Auswertevorgaben der HER-2/neu-Analyse wurden von Rüschoff et al. (2012) publiziert und sind heute allgemein akzeptiert.

HER-2/neu-Immunzytochemie

Sofern man die Antigen-Antikörper-Reaktionen von immunhistochemischen Anwendungen technisch etwas modifiziert, sind sie auch an zytologischen Präparaten durchführbar und werden dann als "Immunzytochemie" bezeichnet. Auch für HER-2/neu ist eine entsprechende Option gegeben. Allerdings gibt es für die Immunzytochemie keine eigene allgemeine Vorgabe zur Auswertung. Meistens wird ebenfalls mit dem DAKO-Score gearbeitet.

1.3.2 Bestimmung des HER-2/neu-Status durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der FISH-Untersuchung, bei der mit Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte DNA-Sonden auf durch Hitzedenaturierung einzelsträngig gemachte Tumor-DNA hybridisiert werden, setzt man für die HER-2/neu-Darstellung zwei Hybridisierungssonden ein. Vom Prinzip her wird zum einen über die Anwendung einer Sonde zur Darstellung Zentromer-naher Abschnitte des Chromosoms 17 („CEP 17“) ermittelt, wie viele dieser Chromosomen in der jeweiligen Tumorzelle vorhanden sind. Eine Sonde aus der Region 17q11.2-q12 auf dem Chromosom 17, an der auch das HER-2/neu-Gen kodiert wird („LSI 17.2“), lässt aufgrund der Zahl ihrer Markierungen auf die Zahl der Genkopien des HER-2/neu-Gens in der Tumorzelle rückschließen. Nach der Auswertung im Fluoreszenzmikroskop wird üblicherweise der Quotient aus der Summe der Signale von LSI 17.2 und von CEP 17 einer vorgegebenen Zahl von Tumorzellen bestimmt. Diese Vorgehensweise ist auch bei Mammakarzinomen (Wolff et al. 2013) und Magenkarzinomen (Rüschoff et al. 2012) akzeptiert. Liegt der Quotient oberhalb des Normalwertes von 2,0, so wird eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens angenommen. In Fällen, in denen sich nach der Analyse von 20 Zellen ein "grenzwertiger" Quotient zwischen 1,8 und 2,2 ergibt, besteht die Möglichkeit bzw. Empfehlung, weitere 20 Zellen aus z.B. auch an anderer Stelle gelegenen Tumorarealen zu untersuchen, um das Endergebnis auf eine bessere Datenbasis zu stellen.

Ein Beispiel für eine Zelle mit einer signifikanten Zunahme der LSI 17.2-Signale im Vergleich zu den CEP 17-Signalen ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

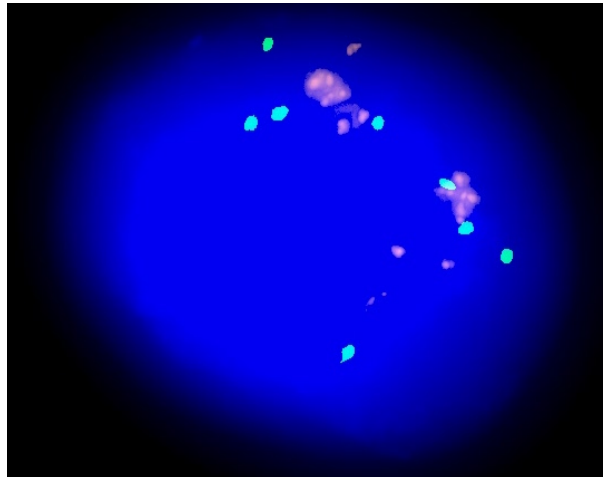


Abb. 2: Beispiel für eine in der FISH HER-2/neu-positive Zelle eines Adenokarzinoms. Objektivvergrößerung 100x.

Im Vergleich zur immunhistochemischen bzw. immunzytochemischen Methode ist die FISH-Untersuchung auf der einen Seite methodisch und zeitlich ungleich aufwendiger und verlangt eine nicht unerhebliche Investition, da sie ohne Fluoreszenzmikroskop sowie einem Bildanalysesystem nicht ausgewertet werden kann. Auf der anderen Seite aber bildet sie eine molekulargenetische Realität ab, geht also in ihrer formalen biologischen Wertigkeit über diejenige der Immunhistochemie hinaus.

In Deutschland wird die FISH zur Bestimmung des HER-2/neu-Status bei Mammakarzinomen in aller Regel nur zur Abklärung eines immunhistochemischen Score 2+ angewandt, anders als beispielsweise in der Schweiz, in der die FISH als Primärmethode bevorzugt wird. Bei Magenkarzinomen ist in den Leitlinien derzeit die Immunhistochemie als Primäruntersuchung festgeschrieben.

1.3.3 Synoptische Darstellung der klassischen HER-2/neu-Bestimmung im klinischen Alltag

Die oben vereinfacht dargestellten Vorgehensweisen in der HER-2/neu-Bestimmung sind in Abbildung 3 unter klinischen Gesichtspunkten synoptisch

zusammengefasst, wobei hier auch auf die chromogene in-situ-Hybridisierung im sichtbaren Licht, die CISH, mit Bezug genommen wird, auf welche aber im Rahmen dieser Studie nicht weiter eingegangen werden soll.

Das Diagramm geht dabei davon aus, dass man (wie auch im klinischen Alltag üblich) nur mit einer der beiden Methoden auskommen möchte. Entsprechend wird (vgl. linke Seite des Diagramms) die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung nur zur Immunhistochemie bei einem Score von 2+ hinzugenommen und nur dann bei einem primären FISH-Ansatz (vgl. rechte Seite des Diagramms) eine ergänzende immunhistochemische Untersuchung empfohlen, wenn sich das FISH-Ergebnis als grenzwertig erweist.

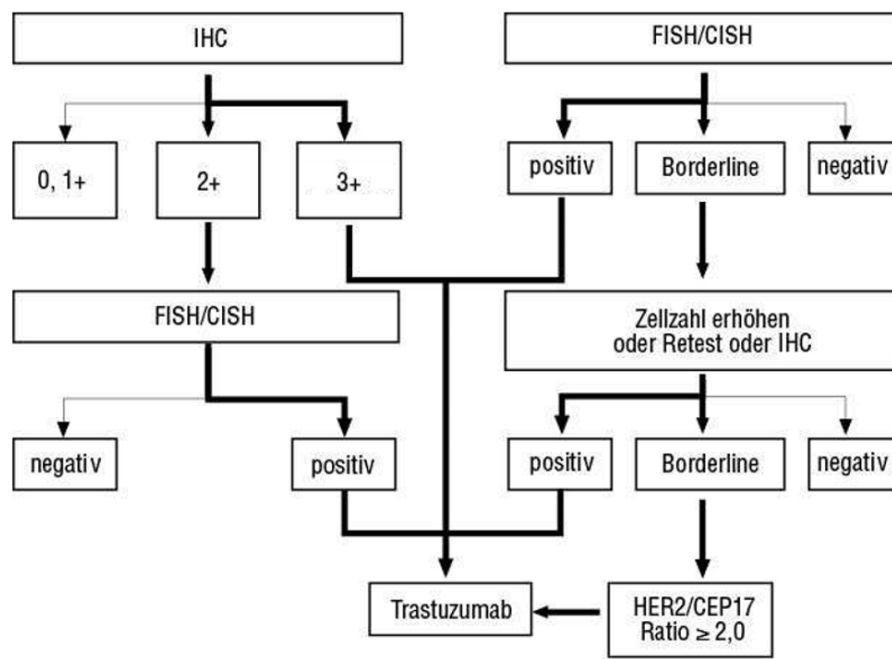


Abb. 3: Algorithmus zur Ermittlung und Interpretation des immunhistochemisch bzw. per FISH ermittelten HER-2/neu-Status im Hinblick auf eine mögliche Trastuzumab-Therapie (aktualisiert und redaktionell korrigiert auf der Basis einer Abbildung aus Mayr und Högel 2013). IHC = Immunhistochemie. "Retest" = Wiederholung der Untersuchung. „Zellzahl erhöhen“ bedeutet, dass bei einem in die Borderline-Kategorie gehörendem Ergebnis nach Auswertung von 20 Zellen weitere 20 untersucht werden sollen, um die Auswertung auf eine breitere Datenbasis zu stellen.

1.3.4 Leitlinien-akzeptierte Modifikation der Auswertung der FISH-basierten HER-2/neu-Bestimmung

Eine Reihe von Jahren wurden FISH-Untersuchungen mit den beiden Sonden LSI 17.2 und CEP 17 so ausgewertet, dass ausschließlich der Quotient der Signale, also $[LSI\ 17.2 / CEP\ 17]$, als Kriterium gewertet wurde. Betrug der Quotient ≥ 2 , so wurde eine Amplifikation im HER-2/neu-Gen angenommen und der Test als positiv gewertet (Dowsett et al. 2001). Die große Mehrzahl der in der Literatur zur Verfügung stehenden Studien ist auf diese Weise ausgewertet worden. Vor einiger Zeit (Wolff et al. 2013) wurde nun diesem Quotienten in einem umfassenden Artikel von der Form eines *Clinical Practice Guideline Update*, verfasst unter Federführung der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) und des *College of American Pathologists* (CAP), ein zweites Kriterium gegenübergestellt, nämlich die durchschnittliche Zahl der LSI 17.2-Signale in den untersuchten Tumorzellen. Dahinter steht insbesondere die Überlegung, dass auch die LSI 17-Signale in polyploiden Zellen berücksichtigt werden sollten, die bisher bei der Quotientenbildung sozusagen unter den Tisch fielen. Ist eine Tumorzelle nämlich z.B. tetraploid, so verfügt sie über vier statt zwei CEP 17-Signale, und eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens in dieser Zelle fiel einzellbezogen erst auf, wenn gleichzeitig mehr als acht LSI 17.2-Signale vorhanden wären. Klinischer Hintergrund der Überlegung ist, dass bei der Quotientenbildung letztendlich die für das Chromosom 17 polysomen Zellen, die proportional erhöht auch das HER-2/neu-Gen tragen, als nicht-amplifiziert gewertet werden, dennoch aber eine erhöhte Zahl von Bindungsstellen für Tyrosinkinasen aufweisen. Geht man hingegen auch auf die Gesamtzahl von LSI 17.2-Signalen bei der Interpretation ein, so würde man solche Zellen, die man als empfänglich für eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren ansieht, klinisch als positiv bewerten.

Entsprechend ist zu erwarten, dass manche nach dem klassischen Interpretationsalgorithmus FISH-negative Fälle nunmehr positiv werden dürften. Umgekehrt ändert sich an der Positivität der bereits nach klassischer Auswertung positiven Fälle nichts.

In Abbildung 4 ist wiedergegeben, wie sich die Autoren des modifizierten Auswertekonzeptes eine Zusammenführung beider Interpretationsmethoden vorstellen.

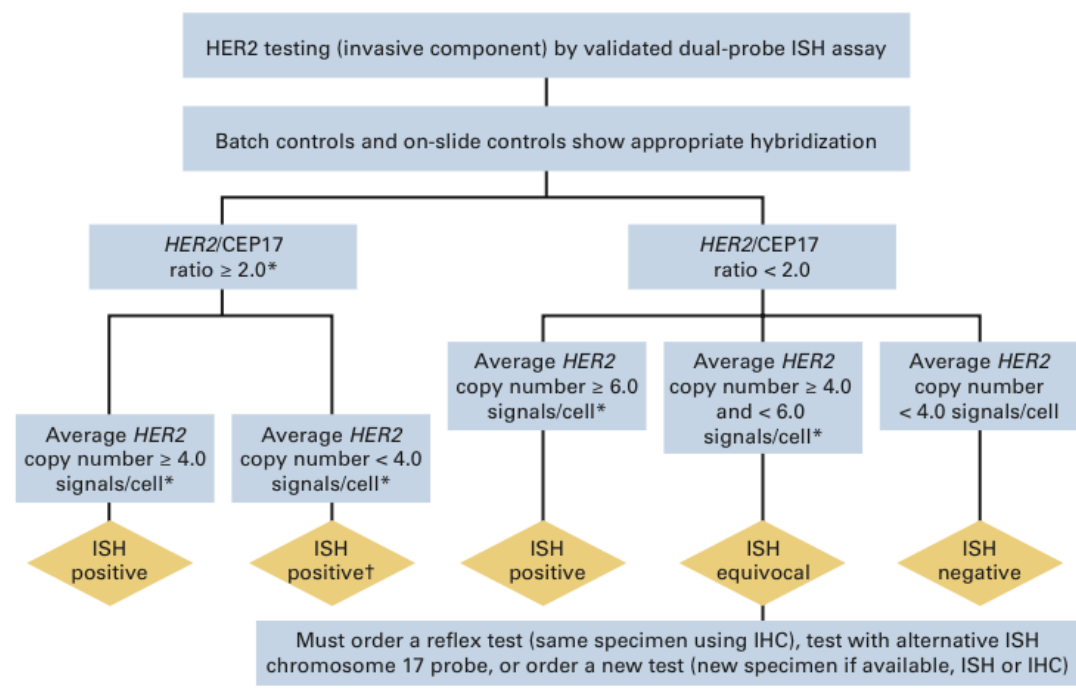


Abb. 4: Modifizierter Testalgorithmus zur Ermittlung und Interpretation des über in-situ-Hybridisierung ermittelten HER-2/neu-Status (nach Wolff et al. 2013). ISH = in-situ-Hybridisierung, IHC = Immunhistochemie. HER2 = LSI 17.2

In die neue S3-Leitlinie zum Mammakarzinom von Dezember 2017, letzte Version von 2019 (S3 Mamma 2019), ist dieser nach dem ASCO benannte Modifikationsvorschlag inzwischen im Kapitel 4.5.3 ("*Bestimmung des Hormonrezeptor- und HER2-Status sowie des Ki-67-Proliferationsindex invasiver Karzinome*") aufgenommen worden und gehört somit zur Leitlinien-gerechten Diagnostik und Therapieplanung mit dazu.

Die S3-Leitlinie für das Magenkarzinom, die zur Zeit der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen galt, war im Februar 2012 veröffentlicht und im Dezember 2015 bis Februar 2017 unverändert verlängert worden (Leitlinienprogramm Onkologie 2012). Seitdem war sie formal außer Kraft. Da sie bereits vor der Modifikation der HER-2/neu-Auswertung erschienen ist, findet sich diese naturgemäß in der Leitlinie nicht wieder. In der oben erwähnten DGHO-Leitlinie

von 2018 wird auf die Art der Bestimmung eines FISH-positiven HER-2/neu-Status überhaupt nicht eingegangen. Aktuell liegt nunmehr allerdings aus dem Jahr 2019 eine erneuerte S3-Leitlinie für das Magenkarzinom vor (Leitlinienprogramm Onkologie 2019a), in der aber ebenfalls die Art der FISH-Auswertung nicht näher spezifiziert ist.

1.4 Problemstellung

Am Schwerpunkt Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden inzwischen gut 100 FISH-basierte Untersuchungen zum HER-2/neu-Status an Proben von Patienten vorgenommen, so dass eine für eine wissenschaftliche Auswertung ausreichende Datenbasis vorliegt. Die vom ASCO 2013 vorgeschlagene modifizierte Auswertung wurde als Anlass genommen, diese anhand der FISH-Protokolle nachträglich auf die Untersuchungsergebnisse anzuwenden. Ziel der Untersuchung war, die Zahl und Art der Fälle zu ermitteln und zu bewerten, bei denen die beiden Auswertemethoden für die HER-2/neu-Bestimmung zu gleichen bzw. zu verschiedenen Ergebnissen gelangten.

Zur späteren klinischen Auswertung wurden die klinischen und prognostischen Daten der Patienten zusammengestellt. Bei den Einsendungen handelte es sich dabei in der großen Mehrzahl nicht um Entnahmen aus der Erstdiagnostik der Tumoren, sondern aus dem Verlauf des Tumorleidens, in welchem es nicht selten beispielsweise zur Ausbildung von Pleurakarzinosen, Peritonealkarzinosen oder Perikardkarzinosen kommt, oft erst viele Jahre nach Beginn des klinischen Tumorleidens. Die Beurteilung solcher Körperhöhlenergüsse gehört zur Standardtätigkeit der klinischen Zytopathologie.

Aus methodischer Sicht ging es darum, abzuschätzen, inwieweit die in der modifizierten Auswertung vorgeschlagenen Grenzwerte, die rein auf histologischen Kriterien beruhten, auch für die Zytologie geeignet sind. Dieses muss nicht zwangsläufig der Fall sein, da sich FISH-Untersuchungen an Histologie und Zytologie methodisch in einem Punkt unterscheiden: Bei FISH-Untersuchungen in der Histologie liegen geschnittene Zellen, also im Grunde Teile von ihnen, vor,

während in der Zytologie die Zellen vollständig zur Verfügung stehen. Dieses könnte bedeuten, dass bei zytologischen FISH-Anwendungen höhere Signalzahlen auftreten könnten, die sich dann in einer abweichenden Grenzwertziehung niederschlagen könnten. Zur Zeit der Planung und Durchführung der Studie war keine gleichartige zytologisch basierte Arbeit in der wissenschaftlichen Literatur dokumentiert.

Zu dieser Arbeit, die Teil einer übergeordneten Gesamtstudie zum Thema "Klinische und methodische Untersuchungen zur Anwendung und Optimierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in der Zytodiagnostik" ist, liegt ein positives Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer 4978 vom 11.2.2015) vor. Die Studiendurchführung erfolgte ab 1.3.2015.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser retrospektiven klinischen Studie wurden alle 106 Patientenfälle von 96 Frauen und 10 Männern (mittleres Patientenalter: 64 Jahre) bearbeitet, deren zytologischen Tumorproben metastasierter Karzinome am Schwerpunkt Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bearbeitet worden waren und bei denen im Rahmen der zytologischen Diagnostik eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Darstellung einer Amplifikation des HER-2/neu-Gens durchgeführt worden war.

Im Einzelnen handelte es sich um

- 84 Erguskarzinosen,
- 8 Lebermetastasen,
- 7 Lymphknotenmetastasen und
- 7 andere Entnahmen.

Da HER-2/neu-Bestimmungen insbesondere bei Mammakarzinomen und metastasierten Magenkarzinomen von klinisch-therapeutischer Relevanz sind, überrascht nicht, dass insgesamt 92 der Primärtumoren Mammakarzinome (86,8%) und 11 Magenkarzinome (10,4%) waren. Bei zwei Patienten war von einem CUP-Syndrom ausgegangen worden, bei einem Patienten waren die Angaben zur Art des Karzinoms nicht eindeutig - aus welchem konkreten Grund diese Proben ebenfalls einer FISH-Untersuchung auf HER-2/neu unterzogen worden waren, ließ sich nicht eindeutig klären. Die 106 Proben stammten dabei nicht nur aus dem Universitätsklinikum, sondern aus insgesamt 40 unterschiedlichen Kliniken und Praxen.

Das früheste Untersuchungsdatum der Patienten an der Universitätsklinik Düsseldorf war der 13.11.2007, das letzte der 4.4.2014. Der Beobachtungszeitraum reichte von 0 - 39 Monaten.

Um die Beobachtungsdauer bestimmen zu können, musste der Überlebensstatus der Patienten ermittelt werden. Hierzu wurden die zuständigen Einwohnermeldeämter schriftlich befragt. Bei sechs Patienten konnten keine entsprechenden Angaben erhoben werden, da sie als COIP-Patienten aus dem Ausland rekrutiert worden waren. Für sie standen aber, genau wie bei den übrigen Patienten auch, die Angaben aus MEDICO, dem elektronischen Patienten- und Befundarchiv des UKD, zur Verfügung.

2.2 Aufarbeitung des eingesandten Materials und konventionelle zytologische Routinediagnostik

Alle Einsendematerialien wurden gemäß den *Standard Operation Procedures* (SOP) der Schwerpunktes Cytopathologie bearbeitet.

Die 84 Ergusskarzinosen lagen als native Flüssigkeiten vor. Aus ihnen wurden nach Zentrifugation jeweils sechs Sedimentausstriche gewonnen, von denen drei mit Alkohol-basiertem Fixationsspray (Merckofix, Merck, Darmstadt) feuchtfixiert wurden. Die übrigen drei wurden luftgetrocknet.

Die übrigen 22 Fälle (Leber- und Lymphknotenpunktate und andere Entnahmen) entstammten Feinnadelpunktaten, aus denen bereits seitens der einsendenden Kliniken Alkohol-fixierte Ausstrichpräparate in variabler Zahl hergestellt worden waren.

Alle Alkohol-fixierten Präparate wurden in einem Färbeautomaten Shandon Varistain 24-4 für die zytologische Routinediagnostik nach Papanicolaou gefärbt. Danach erfolgte die Eindeckelung mit einem konventionellen Eindeckmedium.

Die mikroskopische Beurteilung wurde von einem Facharzt für Pathologie, in vielen Fällen nach Vormustern der Präparate durch eine Zytologieassistentin, vorgenommen. Dabei wurden zur Identifikation der Tumorzellen die üblichen Kriterien der Zytodiagnostik für die Erkennung und Klassifizierung maligner Tumorzellen zugrunde gelegt (siehe insbesondere das Standardwerk von Koss

2005, ferner speziell für Ergusspräparate Shidham und Atkinson 2007), die vor allem auf der Beurteilung von Kernveränderungen basieren. Als besonders wesentlich gelten dabei Veränderungen der Kern-Plasma-Relation der Zellen zugunsten der Kerne sowie Veränderungen der Kernform, der Kerngrößenvariabilität sowie der Chromatinstruktur.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

2.3.1 Prinzip der Untersuchungsmethode

In-situ-Hybridisierungen sind heute in der diagnostischen Pathologie fest etabliert und können als CISH (chromogene in situ-Hybridisierung), SISH (Silber-basierte in-situ-Hybridisierung) oder FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), je nach Art des Visualisierungsverfahrens des Hybridisierungsproduktes, erbracht werden.

Bei der Untersuchung werden durch ein Hybridisierungsverfahren mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden an die zuvor durch Hitzedenaturierung einzelsträngig gemachte DNA der Zellkerne gebunden. Gerade bei zeitgleicher Anwendung mehrerer Sonden bietet sich die Fluoreszenzmikroskopie an. Bei dieser werden nach einer Gegenfärbung des Zellkerns mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI die gefundenen Signale auf die Zahl von Kopien der von den DNA-Sonden repräsentierten Genomabschnitte bezogen und entschieden, ob hierfür eine Amplifikation, eine Deletion oder ein Normalzustand vorliegen. Bei manchen Anwendungen werden auch Fusionsprodukte von Genabschnitten verschiedener Chromosomen nachgewiesen.

Ein Vorteil der FISH ist, dass die Interpretationsalgorithmen oft nur eine sehr geringe Zahl von Tumorzellen voraussetzen. Nachteile der FISH liegen im vergleichsweise hohen Preis für Sachkosten und im erheblichen Aufwand an Zeit und Personal.

2.3.2 Hybridisierungs sonden

Die beiden in dieser Studie verwendeten Sonden sind kommerziell im Handel erhältlich und wurden von Abbott bezogen (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA) (Tab. 1).

Die 226 kB große LSI HER-2/neu-Sonde ist an Chromosom 17 an der Region 17q11.2-q12 lokalisiert, auf der unter anderem das HER-2/neu Gen kodiert ist (Abbildung 5). Daher gibt die Zahl der Signale Auskunft über die Zahl den Genkopien des HER-2/neu-Gens. Die CEP 17-Sonde deckt die Region 17p11.1-q11.1, also die Zentromerregion des Chromosoms 17, ab. Entsprechend lässt sich von der Zahl der Signale auf die Zahl im Zellkern vorhandener Chromosomen 17 rückschließen.

Probenname	Lokalisation der Sonden	Fluorophore
Vysis LSI HER-2/neu	17q11.2-q12	Spectrum Orange
Vysis CEP 17	17p11.1-q11.1	Spectrum Green

Tab. 1: Hybridisierungssonden für die HER-2/neu-FISH-Untersuchungen

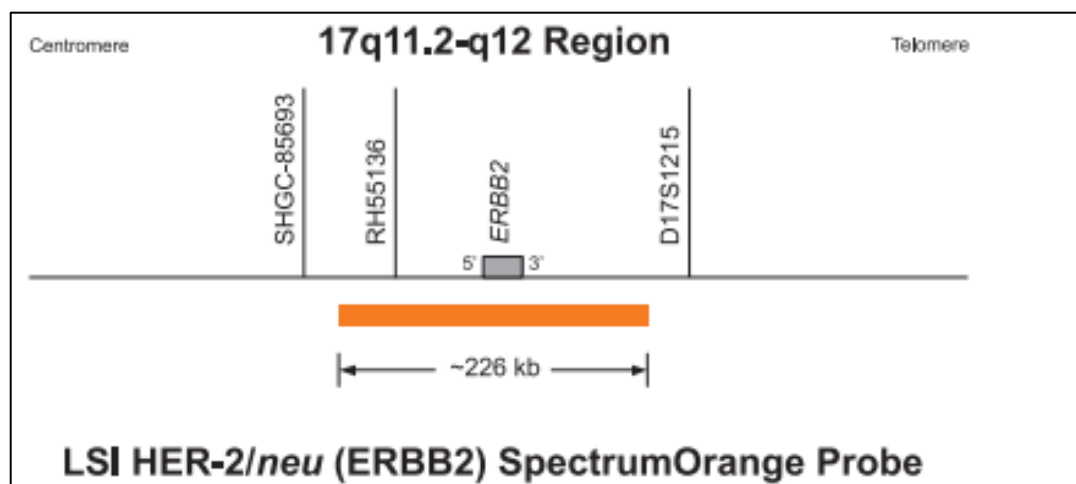


Abb. 5: Schematische Darstellung der Lokalisation der LSI HER-2/neu-Sonde an der Region q11.2-q12 des Chromosoms 17 (modifiziert nach dem Beipackzettel des Sondenkits)

2.3.3 Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Alle FISH-Untersuchungen wurden unter Beachtung der Standard Operation Procedures (SOP) des Schwerpunktes Cytopathologie im Rahmen der adjuvanten Diagnostik als Leistung für die Krankenversorgung durchgeführt.

Am ersten Tag einer FISH-Untersuchung wird zunächst eine Fotokopie des Präparates, auf dessen Deckglas mit einem wasserfesten Stift Region von besonderem diagnostischem Interesse markiert sind, auf einem leeren Blatt Papier durchgeführt. Dadurch wird sichergestellt, dass diese Regionen Markierungen später für die FISH-Untersuchung wiedergefunden werden können, obwohl das Original-Deckglas nicht mehr auf dem Präparat vorhanden ist.

Die Durchführung der Hybridisierung erfolgte danach gemäß dem in der Routinediagnostik am Schwerpunkt Cytopathologie verwendeten SOP-Protokoll. Vom Prinzip her ist es so, dass zunächst die Ziel-DNA denaturiert werden muss, um zu ermöglichen, dass die Sonden an ihre komplementären DNA-Abschnitte binden können. Hiernach erfolgt über Nacht die Hybridisierungsphase, in der die Sonden an die DNA binden. Es folgen am zweiten Arbeitstag verschiedene Waschschriffe, in denen überschüssige Sondenlösungen entfernt werden, eine Gegenfärbung mit dem Fluoreszenz-DNA-Farbstoff DAPI und das Eindecken der Präparate. Diese werden danach bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

2.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der hybridisierten Präparate

Fluoreszenzmikroskop

Die Hybridisierungsergebnisse wurden mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop Axio Imager M1 der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) ausgewertet. Das Mikroskop ist mit je einem Einfachbandpass-Filter Spectrum Blue, Spectrum Green,

Spectrum Orange, Spectrum Rot, Spectrum Gold und Spectrum Aqua versehen. Für die Auswertung der HER-2/neu-Untersuchungen wurden dabei nur die ersten drei genannten Filter verwendet, und zwar der DAPI-Filter für die Identifikation der Tumorzellkerne, Spectrum Green für die Untersuchung von Hybridisierungssignalen von CEP 17 und Spectrum Orange für die Untersuchung von Hybridisierungssignalen von LSI 17.2.

Als Anregungslichtquelle für die Fluoreszenz diente eine 100 W Quecksilberdampflampe. Die Hybridisierungssignale wurden unter Verwendung je eines Öl-immersionsobjektivs mit 63-facher bzw. 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Das Immersionsöl wies dabei keine nennenswerte Autofluoreszenz auf. Somit wurde eine Interferenz mit den gewünschten Signalen weitestgehend ausgeschlossen.

Auswertung der Präparate

Nachdem die auszuwertenden Tumorzellen in der 25- bzw. 40-fachen Vergrößerung in der DAPI-Färbung anhand typischer Kernkriterien (siehe Kapitel 2.2) identifiziert worden waren, wurden die Hybridisierungssignale für CEP 17 und LSI 17.2 pro Fall von mindestens 20, im Durchschnitt gut 30 Zellen (Mittelwert: 32,0; SD: 10,5) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden Zelle für Zelle in einem Dokumentations- und Auswertebogen erfasst (Abbildung 6, umseitig).

Zur Auswertung wurden gemäß den SOPs nur Tumorzellen mit eindeutig zu erkennenden Signalen von rundlicher bis ovaler Form herangezogen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine störenden optische Effekte im Hintergrund zu sehen waren. Sich überlappende Zellkerne verschiedener Tumorzellen wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurden Tumorzellen ausgeschlossen, die für eine oder beide Sonden bei kompletten Durchfokussieren des Zellkerns keine Hybridisierungsprodukte aufwiesen. Sogenannte "gesplittete Signale" wurden als lediglich ein Signal berücksichtigt.

Her2/neu

Eingangs Nr.: C _____ Untersucher: _____

Material : _____ Untersuchungsdatum: _____

FISH-N° : _____ Datum (Tag 1) der Hybridisierung: _____

Her2 DNA Probe Kit II Abbott 6N4630t Lot:461140/ Verf.11.12.2016 / IntelliFish- Hybr.-Puffer Lot:467313/ Verf. 10.03.2016

Analyse von mindestens 20 morphologisch atypische Zellen

Relok	Cells No.	CEP 17 (green)	LSI HER 2 (orange)	Cells No.	Relok	CEP 17 (green)	LSI HER 2 (orange)
	1			21			
	2			22			
	3			23			
	4			24			
	5			25			
	6			26			
	7			27			
	8			28			
	9			29			
	10			30			
	11			31			
	12			32			
	13			33			
	14			34			
	15			35			
	16			36			
	17			37			
	18			38			
	19			39			
	20			40			
Total				Total			
Ratio				Ratio			

Beurteilbarkeit: gut: ☐ eingeschränkt: ☐ schlecht: ☐

Bemerkungen: _____

Amplifikationsstatus	HER2neu (orange)	CEP 17 (grün)	HER2 neu/ CEP17 Quotient
Total score 1-20			

	HER2neu	Zellzahl	HER2 neu Signale/Zellzahl
Durchschnitt der HER2neu-Signale			

- ☐ **negativ**, keine HER2/neu Gen Amplifikation
- Ratio < 2
 - durchschnittliche Genkopienzahl <4
- ☐ **zweifelhafter HER2-Status** (mind. 40 morphologisch atypische Zellen)
- Ratio < 2 und durchschnittliche Genkopienzahl ≥4 und <6 pro Zellkern
- ☐ **positiv**, Amplifikation des HER2/ neu - Gens
- Ratio ≥ 2 oder durchschnittliche Genkopienzahl >6

Fotos gemacht: ja ☐ nein ☐

Abb. 6: Dokumentations- und Auswertebogen der FISH-Untersuchungen für HER-2/neu. Erfasst werden neben den klinischen Daten diverse Qualitätskriterien, ferner die CEP 17- und LSI 17.2-Signale jeder analysierten Zelle sowie die Ergebnisinterpretation.

Pro Präparat werden ein oder mehrere charakteristische Tumorzellkerne fotodokumentiert. Hierzu werden Aufnahmen der bei Durchfokussieren ermittelten CEP 17- und LSI 17.2-Signale in einer gemeinsamen Darstellung auf eine Aufnahme des DAPI-gefärbten Zellkerns projiziert (Abbildung 7). Alle vier Aufnahmen werden dem Ergebnisfile der FISH-Untersuchung beigelegt, und das resultierende Projektionsbild wird im Befundausdruck für die beauftragende Klinik mit ausgedruckt.

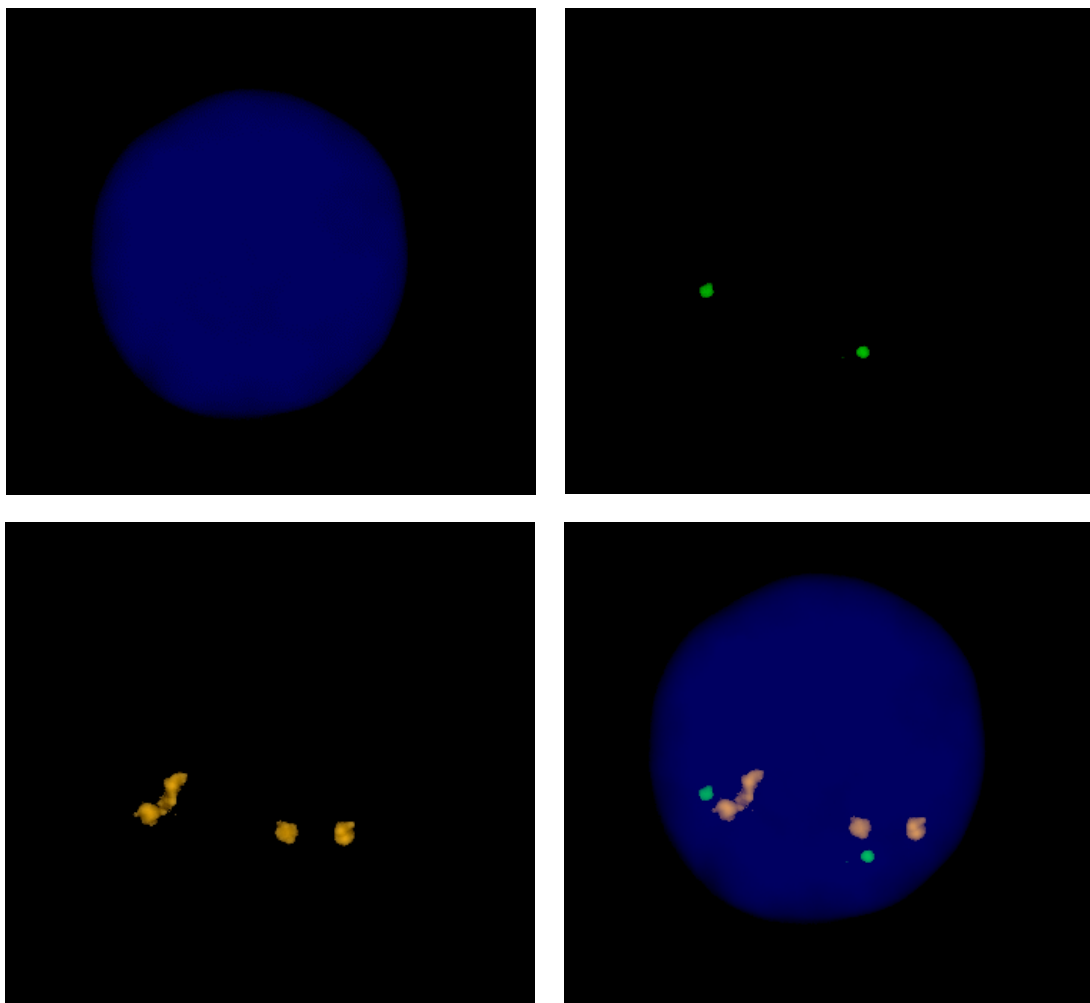


Abb. 7: Bildliche Darstellung eines FISH-untersuchten Zellkerns. Oben links: Bild im Spectrum Blue-Filterbereich zur Darstellung des DAPI-gefärbten Zellkerns. Oben rechts: Summationsbild aller untersuchten Ebenen im Spectrum Green-Filterbereich, zwei CEP 17-Signale. Unten links: Summationsbild aller untersuchten Ebenen im Spectrum Orange-Filterbereich, fünf LSI 17.2-Signale. Unten rechts: Virtuelle Überlagerung der drei DAPI-, CEP 17- und LSI 17.2-Bilder als Dokumentation des Ergebnisses der FISH-Untersuchung.

2.4 Datensatz für die methodischen und klinischen Auswertungen

Patientendaten / Klinische Daten

An Patientendaten bzw. klinischen Daten standen zur Verfügung:

- Alter und Geschlecht der Patienten
- Art der Materialgewinnung (Ergusspunktat / Feinnadelaspirat)
- Lokalisation des Materials
- Maligne Grunderkrankung
- Weitere, allerdings recht heterogene Angaben vom Einsendeschein (z.B. Hormonrezeptorstatus bei Fällen von Mammakarzinomen, Jahr der Erstdiagnose, Art der Vorbehandlungen) bzw. bei Patienten des UKD entsprechende Daten aus dem MEDICO-System

Variable zur Auswertung der FISH-Untersuchung

An Grunddaten aus der FISH-Untersuchung wurden pro Präparat erhoben:

- Zahl der untersuchten Zellkerne
- Gesamtzahl der CEP 17-Signale
- Gesamtzahl der LSI 17.2-Signale
- Zahl der Zellkerne mit ≤ 4 LSI 17.2-Signalen
- Zahl der Zellkerne mit 5 LSI 17.2-Signalen
- Zahl der Zellkerne mit 6 LSI 17.2-Signalen
- Zahl der Zellkerne mit > 6 LSI 17.2-Signalen

Als abgeleitete Größen wurden errechnet:

- LCRAT, der Quotient aus der Zahl der LSI 17.2-Signale und der Zahl der CEP 17-Signale,
- LZRAT, der Quotient aus der Zahl der LSI 17.2-Signale und der Zahl untersuchter Zellkerne.

LCRAT repräsentiert dabei die klassische Auswertemethode der FISH-Untersuchung für HER-2/neu, LZRAT die modifizierte Auswertemethode nach den ASCO-Vorgaben (Wolff et al. 2013).

Beurteilung der FISH-Untersuchung als "positiv" bzw. "negativ"

Gemäß den Vorgaben der Auswertemethoden war ein FISH-Ergebnis positiv für

- LCRAT ≥ 2 bzw.
- LZRAT ≥ 6

2.5 Statistische Untersuchungen

Die statistischen Untersuchungen erfolgten mit dem am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeführten Programmpaket BMDP des Department of Biomathematics der University of California, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA (Dixon 1981).

Neben biometrischen Grunddaten der deskriptiven Statistik (Median, Mittelwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient) wurden insbesondere Überlebenskurven von Patientengruppen nach der *product limit method* (Kaplan und Meier 1958) erstellt und mit dem Wilcoxon-Breslow-Test bzw. dem Mantel-Cox-Test auf signifikante Unterschiede getestet.

Bezogen auf einen etwaigen statistischen Unterschied zwischen ungünstigen und günstigen Verläufen ergaben sich als Nullhypothese H_0 und als Alternativhypothese H_1 :

H_0 : Ungünstiger und günstiger Verlauf sind bezogen auf die verglichenen Variablenausprägungen ohne signifikanten Unterschied verteilt.

H₁: Ungünstiger und günstiger Verlauf sind bezogen auf die verglichenen Variablenausprägungen signifikant unterschiedlich verteilt.

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein α -Niveau von 0,05 angenommen, entsprechend einer Wahrscheinlichkeit von $< 5\%$, die Nullhypothese H₀ irrtümlich zu verwerfen.

Wegen der in dieser Arbeit vorliegenden multiplen Testproblematik, entstanden durch die Tatsache, dass anhand eines Kollektivs mehrere statistische Tests bzgl. verschiedener Zielparameter durchgeführt werden, wurde die statistische Auswertung bei allen Untersuchungen explorativ angesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Methodischer Vergleich der HER-2/neu-Auswertungen

Die Tabellen 2 bis 7 stellen den Vergleich der Auswertungen von der HER-2/neu-Auswertung über den Signalquotienten (LCRAT) zur Auswertung mit der durchschnittlichen Signalzahl (LZRAT) dar, und zwar für alle 106 Fälle (Tabelle 2), die 92 Fälle von Mammakarzinomen (Tabelle 3) und die 11 Fälle von Magenkarzinomen (Tabelle 4); die drei Fälle mit CUP-Syndrom blieben unberücksichtigt.

Signalquotient LSI 17.2 / CEP 17	Quotient LSI 17.2-Signale / Tumorzellzahl		
	negativ (< 6)	positiv (≥ 6)	total
negativ (< 2)	65	11	76
positiv (≥ 2)	8	22	30
total	73	33	106

Tab. 2: Korrelation zwischen der HER-2/neu-Auswertung über den Signalquotienten bzw. die durchschnittliche Signalzahl für 106 Fälle metastasierter Karzinome, $p < 0,0001$

Signalquotient LSI 17.2 / CEP 17	Quotient LSI 17.2-Signale / Tumorzellzahl		
	negativ (< 6)	positiv (≥ 6)	total
negativ (< 2)	56	9	65
positiv (≥ 2)	7	20	27
total	63	29	92

Tab. 3: Korrelation zwischen der HER-2/neu-Auswertung über den Signalquotienten bzw. die durchschnittliche Signalzahl für 92 Fälle metastasierter Mammakarzinome, $p < 0,0001$

Signalquotient LSI 17.2 / CEP 17	Quotient LSI 17.2-Signale / Tumorzellzahl		
	negativ (< 6)	positiv (≥ 6)	total
negativ (< 2)	8	1	9
positiv (≥ 2)	1	1	2
total	9	2	11

Tab. 4: Korrelation zwischen der HER-2/neu-Auswertung über den Signalquotienten bzw. die durchschnittliche Signalzahl für 11 Fälle metastasierter Magenkarzinome; aufgrund geringer Fallzahl nicht statistisch ausgewertet

Insgesamt zeigen die Tabellen 2 bis 4 ein ähnliches Bild, was insofern nicht überrascht, als sie auf die gleiche Grundgesamtheit von Fällen zurückgreifen.

65 der 106 Fälle (61,3%) waren mit beiden Auswertemethoden negativ, 22 (20,8%) mit beiden positiv. Nur über die Signalzahl waren 11 Fälle positiv (10,4%), rein über den Signalquotienten 8 Fälle (7,5%). Die Konkordanz betrug 82,1% ($p < 0,001$, Tab. 2). Für die beiden Teilgruppen der Mammakarzinome und der Magenkarzinome ergaben sich ganz ähnliche Konkordanzraten von 82,5% bzw. 81,8% (jeweils $p < 0,001$, Tab. 3 bzw. Tab. 4).

Geht man von den "klassisch positiven Fällen" aus, so erhöht sich durch die Modifikation der Auswertung die Zahl der positiven Fälle, bezogen auf alle 106 Patienten, von 30 auf 41 (28,3% vs. 38,7%). Für die 92 Fälle von Mammakarzinomen steigt die Zahl der Positiven von 27 auf 36 (29,3% vs. 39,1%). Für die 11 Fälle von Magenkarzinomen kommt zu den beiden nach dem klassischen Verfahren positiven Fällen ein dritter hinzu (18,2% vs. 27,3%).

Dies bedeutet, dass die Zahl der Positiven relativ gesehen jeweils um ca. zehn Prozentpunkte ansteigt und somit einer entsprechend höheren Zahl von Patienten zusätzlich eine Trastuzumab-Therapie angeboten werden könnte.

3.2 Univariate Überlebensanalyse für das gesamte Patientenkollektiv

Für 99 der 106 Patienten konnten Follow-up-Daten ermittelt werden. Für diese werden im Folgenden Überlebenskurven bezogen auf verschiedene klinische Aspekte vorgestellt. Danach erfolgen weitere Analysen für Teilkollektive.

3.2.1 Allgemeine klinische Daten

Das mittlere Alter der 99 Patienten betrug bei der Diagnosestellung $64,0 \pm 12,8$ (SD) Jahre. Der jüngste Patient war 41 Jahre und der älteste 89 Jahre alt.

Die mittlere Beobachtungsdauer betrug $10,7 \pm 10,2$ (SD) Monate. Am Ende der Beobachtungsdauer waren 62 von 99 Patienten verstorben. Die 6-, 12- bzw. 24-Monate-Überlebenswahrscheinlichkeiten lagen bei 60,6%, 46,8% bzw. 32,6%.

Die Überlebenskurve für alle 99 Patienten ist in Abb. 8 wiedergegeben.

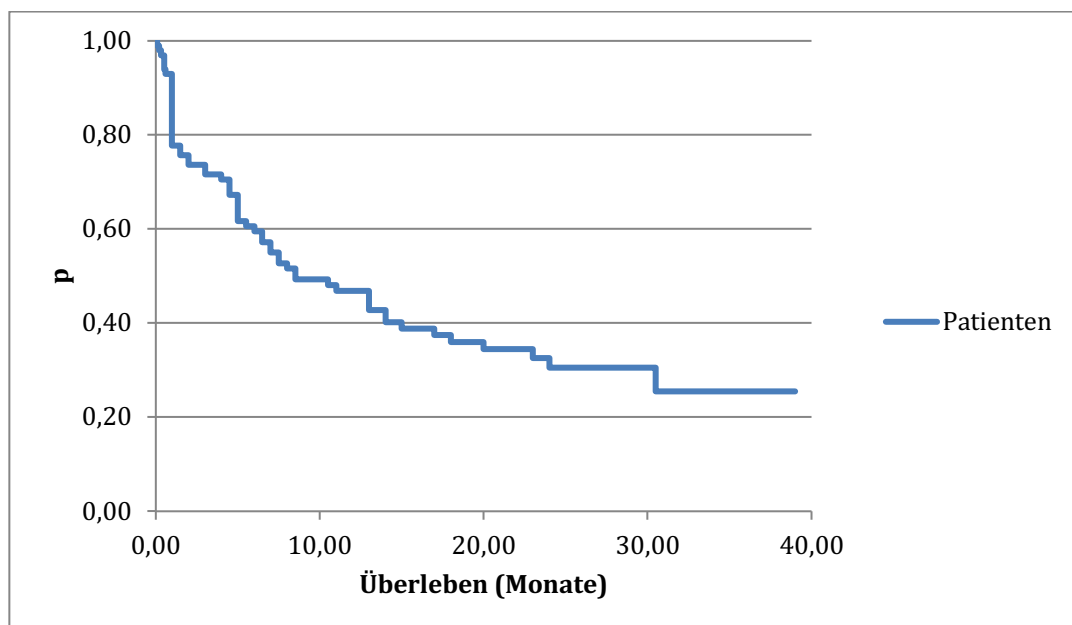


Abb. 8: Überlebenskurve für alle 99 Patienten

3.2.2 Geschlecht der Patienten

Überwiegend waren die Patienten Frauen, was an dem Überwiegen der Mammakarzinome im Patientengut liegt. Tabelle 5 und Abbildung 9 zeigen, dass das Geschlecht der Patienten keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatte.

Geschlecht der Patienten	w	m
Patientenzahl	89	10
davon verstorben	55	7
mittl. Überleben (Monate)	15,7	13,9
6-Monate-ÜLW (%)	60,8	58,3
12-Monate-ÜLW (%)	46,8	46,7
24-Monate-ÜLW (%)	33,7	23,3

Tab. 5: Überleben in Beziehung zum Geschlecht für alle 99 Patienten. $p = 0,6793$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,6701$ (Breslow)

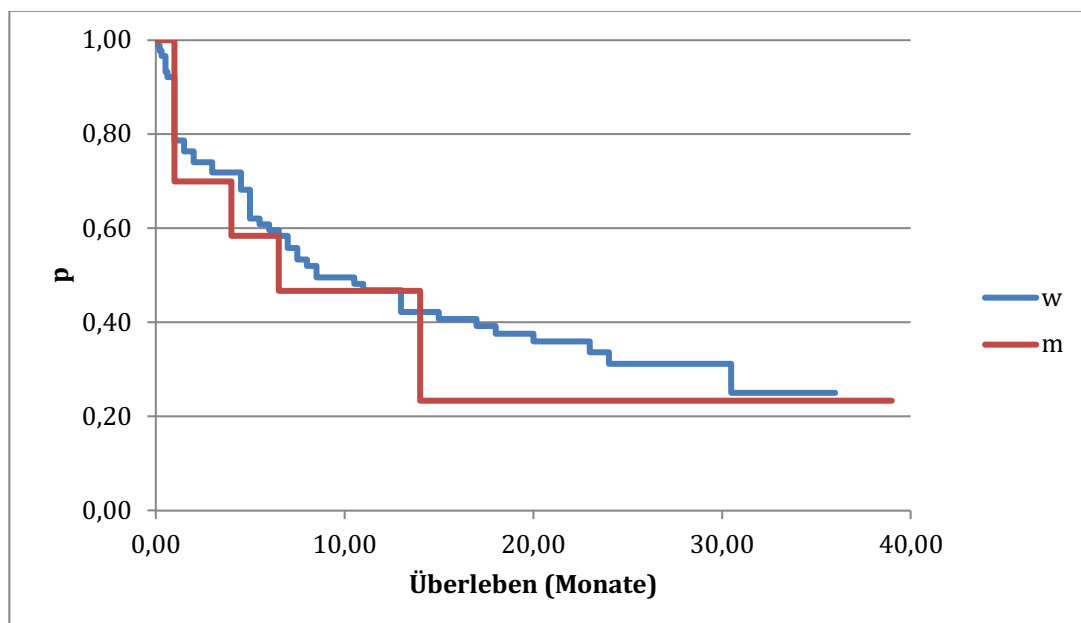


Abb. 9: Überlebenskurven zum Geschlecht für alle 99 Patienten.

3.2.3 Alter der Patienten

Die Analyse zum Alterseinfluss erfolgte nach 1:2:1-Quantilisierung, aus denen die in Tabelle 6 dargestellten Grenzwerte resultieren. Die Überlebensdaten und Überlebenskurven lassen keinen signifikanten Einfluss des Alters auf die Prognose erkennen ($p > 0,05$).

Patientenalter	≤ 55	56-72	≥ 73
Patientenzahl	25	51	23
davon verstorben	16	31	15
mittl. Überleben (Monate)	16,0	17,0	13,3
6-Monate-ÜLW (%)	59,0	59,8	63,8
12-Monate-ÜLW (%)	54,4	44,5	43,0
24-Monate-ÜLW (%)	39,6	33,0	23,0

Tab. 6: Überleben in Beziehung zum Patientenalter für alle 99 Patienten.
 $p = 0,8971$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,9669$ (Breslow)

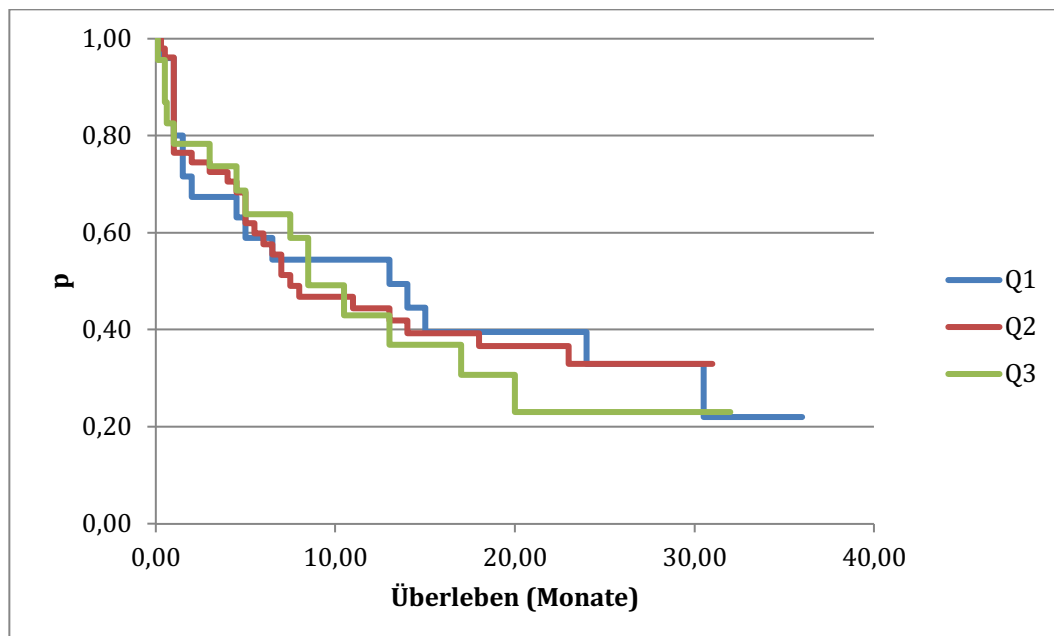


Abb. 10: Überlebenskurven zum Patientenalter bei allen 99 Patienten

3.2.4 Entnahmelokalisation

Tabelle 7 und Abbildung 11 zeigen die Datenverteilung und die Überlebenskurven für die Entnahmelokalisation, aus denen sich kein unmittelbarer Einfluss auf den klinischen Verlauf ablesen lässt, Pleurakarzinosen aber offenbar günstiger verlaufen.

Entnahmelokalisation	Pleura	Bauchhöhle	Perikard	LK	Leber	Pankreas	Mediastinum	Liquor	Lunge
Patientenzahl	58	16	5	7	7	1	1	3	1
davon verstorben	30	14	5	4	6	0	0	3	0
mittl. ÜL (Monate)	19,5	9,7	7,1	18,8	9,1	25,0	18,0	7,3	9,0
6-Mon.-ÜLW (%)	64,4	35,7	60,0	71,4	57,1	-	-	66,7	-
12-Mon.-ÜLW (%)	47,8	35,7	20,0	71,4	42,9	-	-	33,3	-
24-Mon.-ÜLW (%)	41,3	21,4	0	42,9	14,3	-	-	0	-

Tab. 7: Überleben in Beziehung zur Entnahmelokalisation ($p = 0,0992$ (Mantel-Cox); $p = 0,3827$ (Breslow)) für alle 99 Patienten

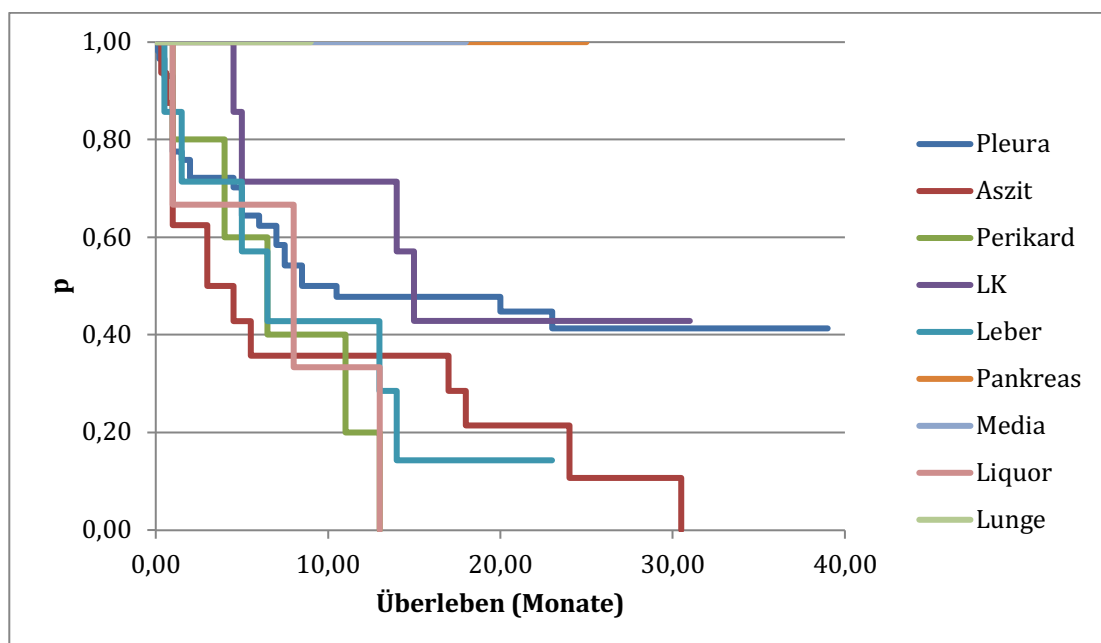


Abb. 11: Überlebenskurven zur Entnahmelokalisation für alle 99 Patienten

Fasst man die Entnahmelokalisationen in drei Gruppen zusammen, so ergibt sich die in Tabelle 8 dargestellte Datenverteilung. Abbildung 12 dokumentiert die Überlebensunterschiede, die allerdings nur im Mantel-Cox-Test eine statistische Signifikanz aufwiesen ($p = 0,0210$).

Entnahmelokalisation	Pleura	Peritoneum / Perikard	andere
Patientenzahl	58	21	20
davon verstorben	30	19	13
mittl. Überleben (Monate)	19,5	8,9	15,5
6-Monate-ÜLW (%)	64,4	41,6	70,0
12-Monate-ÜLW (%)	47,8	31,2	60,0
24-Monate-ÜLW (%)	41,3	15,6	33,7

Tab. 8: Überleben in Beziehung zur Entnahmeregion für alle 99 Patienten. $p = 0,0210$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,0970$ (Breslow)

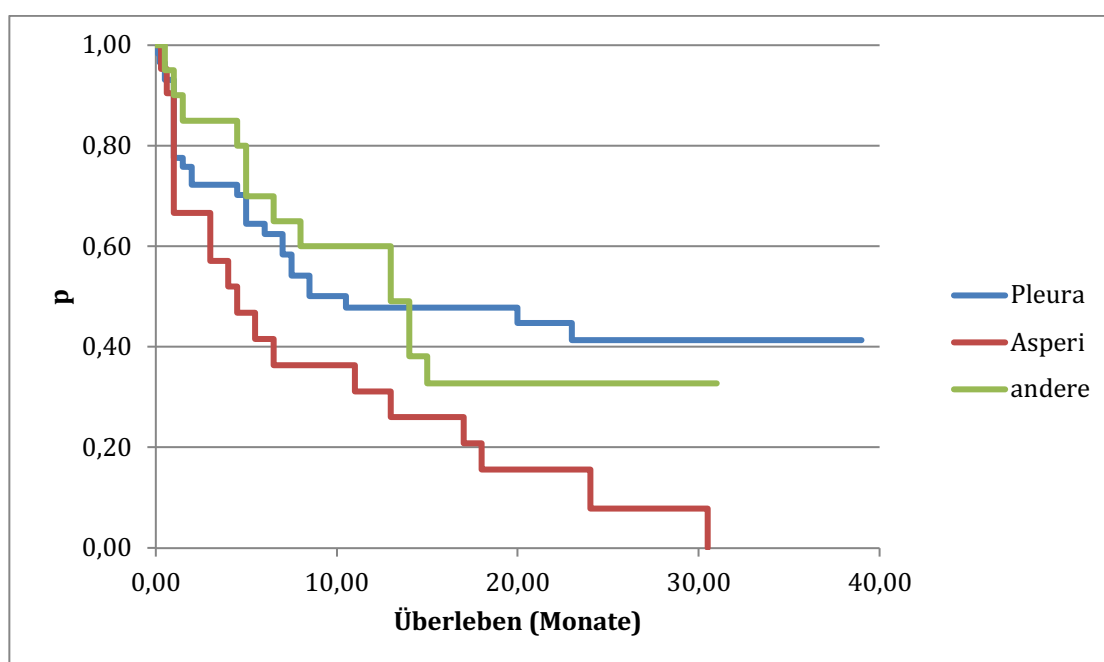


Abb. 12: Überlebenskurven zur Entnahmelokalisation für alle 99 Patienten, dargestellt in drei Gruppen (Pleuraerguss, Aszites / Perikarderguss, andere)

Außerdem wurde ein paarweiser Vergleich für diejenigen 79 Patienten vorgenommen, bei denen die Materialentnahmen aus Ergusskarzinosen stammten. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Überlebensdaten und den Überlebenskurven zwischen Pleurakarzinosen auf der einen sowie Peritoneal- bzw. Perikardkarzinosen auf der anderen Seite (Tabelle 9, Abbildung 13), welcher im Mantel-Cox-Test statistisch signifikant war ($p = 0,0073$).

Entnahmelokalisation	Pleura	Peritoneum / Perikard
Patientenzahl	58	21
davon verstorben	30	19
mittl. Überleben (Monate)	19,5	8,9
6-Monate-ÜLW (%)	64,4	41,6
12-Monate-ÜLW (%)	47,8	31,2
24-Monate-ÜLW (%)	41,3	15,6

Tab. 9: Überleben in Beziehung zur Entnahmeregion für 79 Patienten mit Ergusskarzinosen. $p = 0,0073$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,0694$ (Breslow)

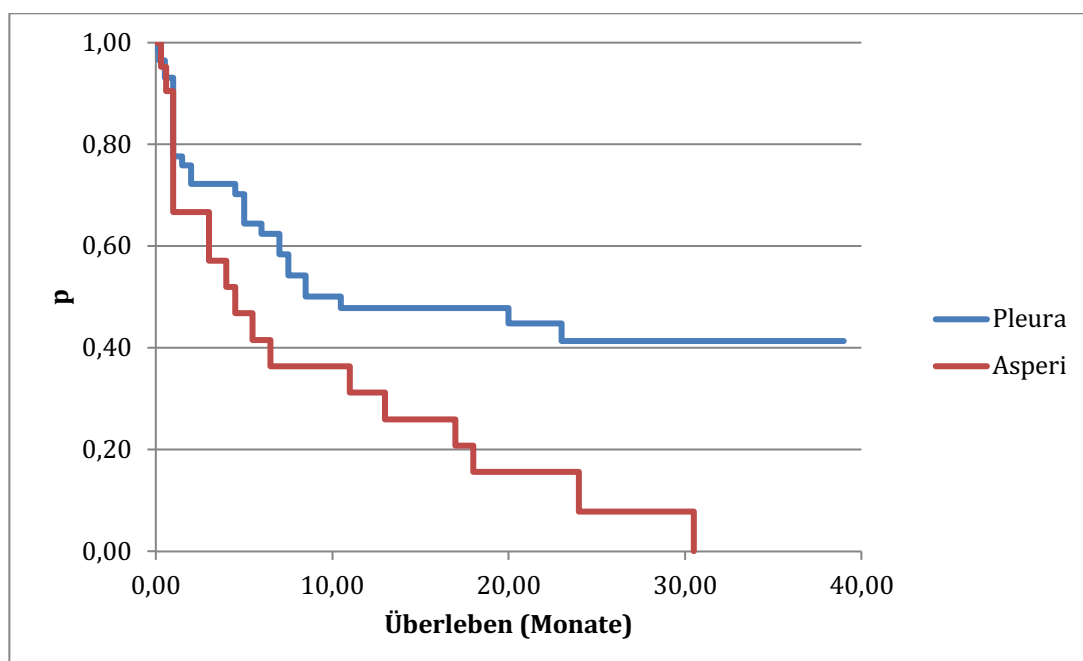


Abb. 13: Überlebenskurven zur Entnahmelokalisation für 79 Patienten mit Pleurakarzinose (blau) bzw. Peritoneal- oder Perikardkarzinose (rot)

3.2.5 Tumorentität des Primärtumors

Die Primärtumoren der Fälle hatten ganz überwiegend in der Mamma (n = 88) bzw. im Magen (n = 9) vorgelegen. Tabelle 10 und Abbildung 14 zeigen, dass zwischen den beiden Tumorentitäten selbst im metastasierten Stadium noch deutliche Unterschiede im Überleben der Patienten bestehen.

Grunderkrankung	Mammakarzinom	Magenkarzinom
Patientenzahl	88	9
davon verstorben	52	8
mittl. Überleben (Monate)	16,5	8,5
6-Monate-ÜLW (%)	63,6	33,3
12-Monate-ÜLW (%)	49,2	33,5
24-Monate-ÜLW (%)	35,9	11,1

Tab. 10: Überleben in Beziehung zur Grunderkrankung für 97 Patienten. $p = 0,0541$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,0463$ (Breslow). Zwei Fälle von CUP wurden nicht berücksichtigt.

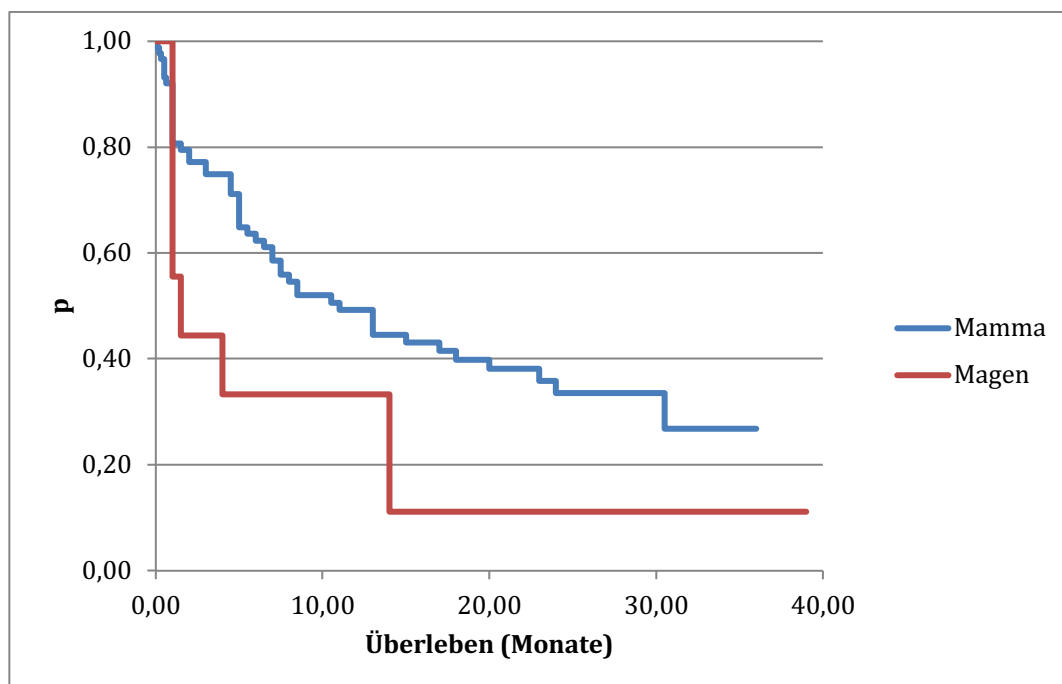


Abb. 14: Überlebenskurven zur Tumorentität des Primärtumors für 97 Patienten mit Mamma- bzw. Magenkarzinom

3.2.6 HER-2-neu-Status (Quotienten-bezogene klassische Auswertung)

Tabelle 11 und Abbildung 15 weisen aus, dass dem klassisch bestimmten HER-2/neu-Status in unserem Patientenkollektiv keine prognostische Bedeutung zukommt; dies belegt graphisch insbesondere der sich mehrfach überschneidende Kurvenverlauf ($p > 0,05$).

LCRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	72	27
davon verstorben	45	17
mittl. Überleben (Monate)	16,0	13,9
6-Monate-ÜLW (%)	58,5	66,1
12-Monate-ÜLW (%)	45,7	49,6
24-Monate-ÜLW (%)	33,3	29,8

Tab. 11: Überleben in Beziehung zum klassisch ausgewerteten HER-2/neu-Status für alle 99 Patienten. $p = 0,8873$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,7577$ (Breslow)

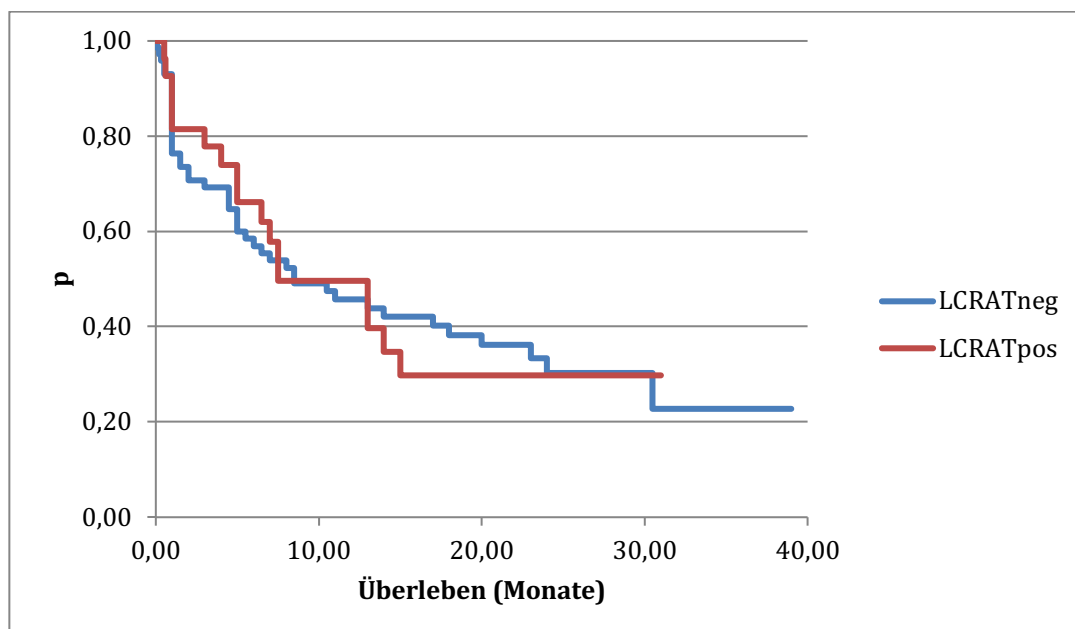


Abb. 15: Überlebenskurven zur klassischen Auswertung des HER-2/neu-Status für alle 99 Patienten

3.2.7 HER-2-neu-Status (Signal-bezogene modifizierte Auswertung)

Tabelle 12 und Abbildung 16 weisen aus, dass auch der Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status in unserem Patientenkollektiv keine prognostische Bedeutung zukommt; dies zeigt ebenfalls insbesondere der sich graphisch mehrfach überschneidende Kurvenverlauf ($p > 0,05$).

LZRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	70	29
davon verstorben	44	18
mittl. Überleben (Monate)	16,2	13,4
6-Monate-ÜLW (%)	61,7	57,9
12-Monate-ÜLW (%)	48,5	42,5
24-Monate-ÜLW (%)	32,1	33,0

Tab. 12: Überleben in Beziehung zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für alle 99 Patienten. $p = 0,8085$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,5770$ (Breslow)

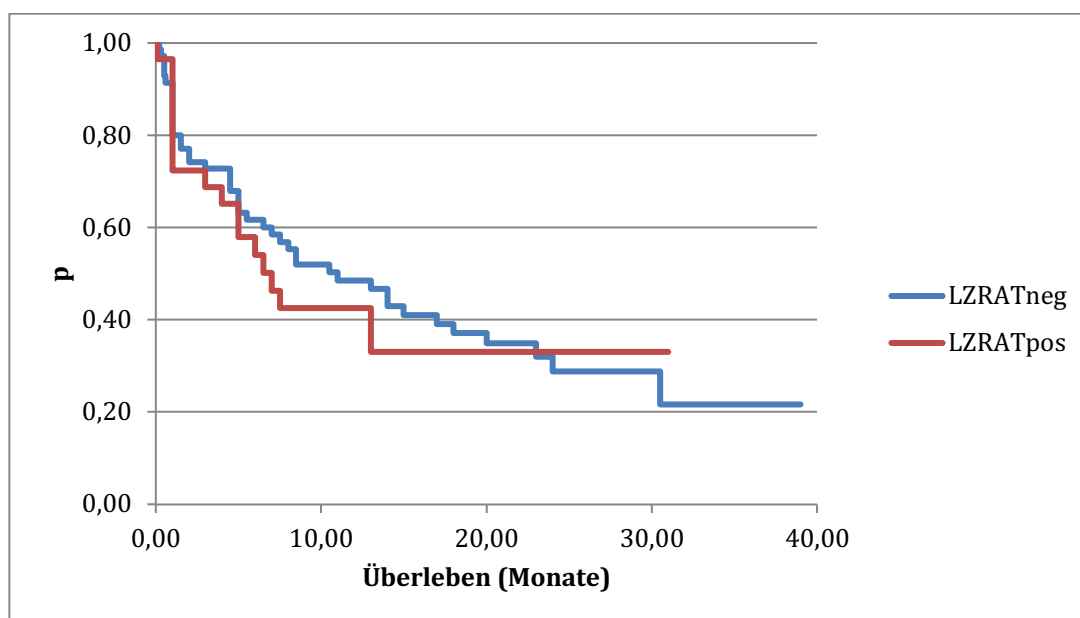


Abb. 16: Überlebenskurven zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für alle 99 Patienten

3.2.8 HER-2-neu-Status (Auswertung gemäß ASCO)

Tabelle 13 und Abbildung 17 zeigen die Ergebnisse der Auswertung gemäß den ASCO-Vorgaben. Im Vergleich beider Gruppen ergibt sich auch hier ein Trend zugunsten der HER-2/neu-negativen Fälle, der aber nicht statistisch signifikant ist ($p > 0,05$).

HER-2/neu gemäß ASCO	negativ	positiv
Patientenzahl	62	37
davon verstorben	38	24
mittl. Überleben (Monate)	16,7	12,7
6-Monate-ÜLW (%)	61,7	58,6
12-Monate-ÜLW (%)	48,8	43,2
24-Monate-ÜLW (%)	34,2	28,8

Tab. 13: Überleben in Beziehung zur Auswertung des HER2-neu/Status gemäß ASCO für alle 99 Patienten. $p = 0,5494$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,3904$ (Breslow)

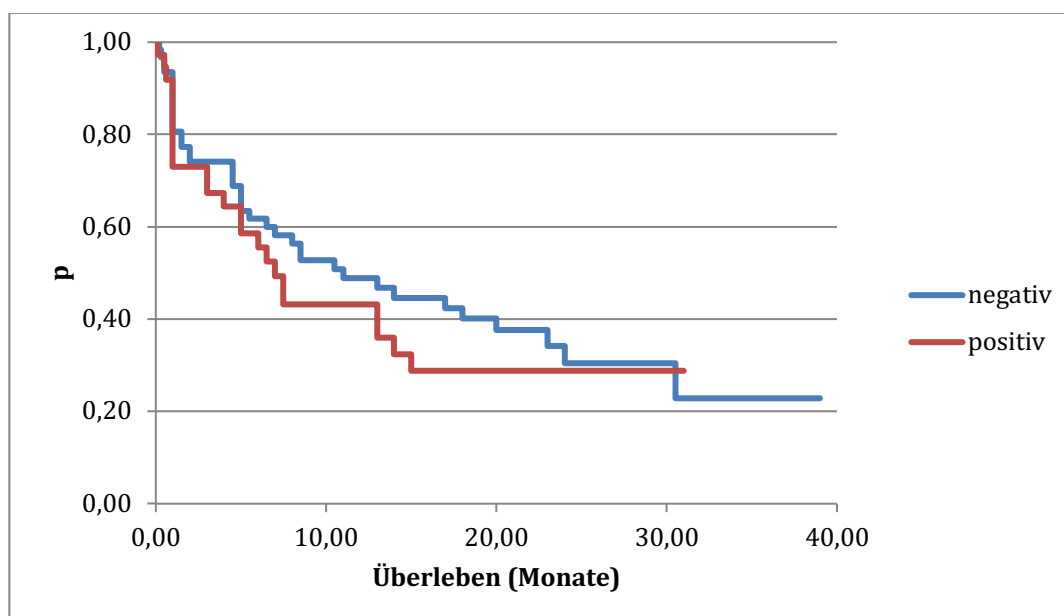


Abb. 17: Überlebenskurven zur Auswertung des HER-2/neu-Status gemäß ASCO-Vorgaben für alle 99 Patienten

3.3 Univariate Überlebensanalyse für die Gruppe der Mammakarzinome

Aufgrund der hohen Zahl von 88 Fällen von Mammakarzinomen (88,9%) wurden einzelne ergänzende Analysen für dieses Teilkollektiv angeschlossen.

3.3.1 Alter der Patienten

Tabelle 14 und Abbildung 18 zeigen, dass das Alter der Patienten nach 1:2:1-Quantilisierung keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatte.

Patientenalter	≤ 55	56-72	≥ 73
Patientenzahl	22	43	23
davon verstorben	13	24	15
mittl. Überleben (Monate)	17,6	15,7	13,3
6-Monate-ÜLW (%)	62,6	64,0	63,8
12-Monate-ÜLW (%)	57,4	48,1	43,0
24-Monate-ÜLW (%)	45,9	37,1	23,0

Tab. 14: Überleben in Beziehung zum Alter für 88 Patienten mit Mammakarzinom. $p = 0,6976$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,8149$ (Breslow)

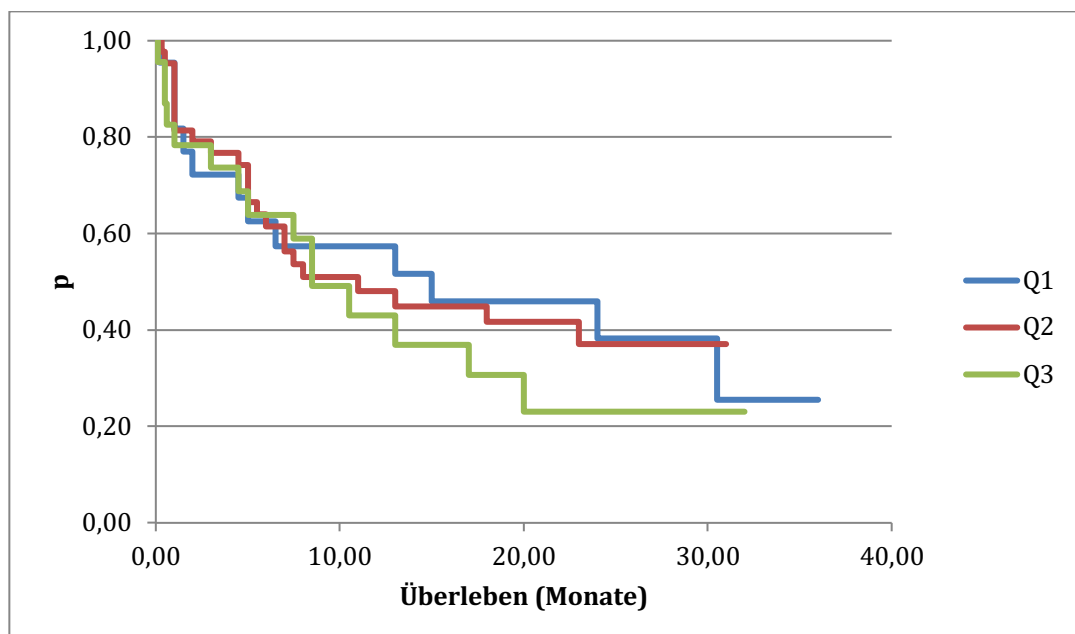


Abb. 18: Überlebenskurven zum Patientenalter bei 88 Patienten mit Mammakarzinom

3.3.2 Entnahmelokalisation

Tab. 15 und Abb. 19 zeigen die Datenverteilung und die Überlebenskurven für die Entnahmelokalisation der 88 Proben von Patienten mit Mammakarzinomen. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht; die häufigen Pleurakarzinosen gehörten zu den Lokalisationen mit günstigerem Verlauf.

Entnahme- lokalisierung	Pleura	Bauchhöhle	Perikard	LK	Leber	Pankreas	Mediastinum	Liquor	Lunge
Patientenzahl	55	13	3	6	5	1	1	3	1
davon verstorben	28	11	3	3	4	0	0	3	0
mittl. ÜL (Monate)	18,5	11,8	10,2	19,6	8,6	25,0	18,0	7,3	9,0
6-Mon.-ÜLW (%)	66,1	44,0	-	66,7	40,0	-	-	66,7	-
12-Mon.-ÜLW (%)	48,4	44,0	33,3	66,7	40,0	-	-	33,3	-
24-Mon.-ÜLW (%)	41,4	26,4	0	50,0	20,0	-	-	0	-

Tab. 15: Überleben in Beziehung zur Entnahmelokalisation für 88 Patienten mit Mammakarzinom. $p = 0,3228$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,6755$ (Breslow)

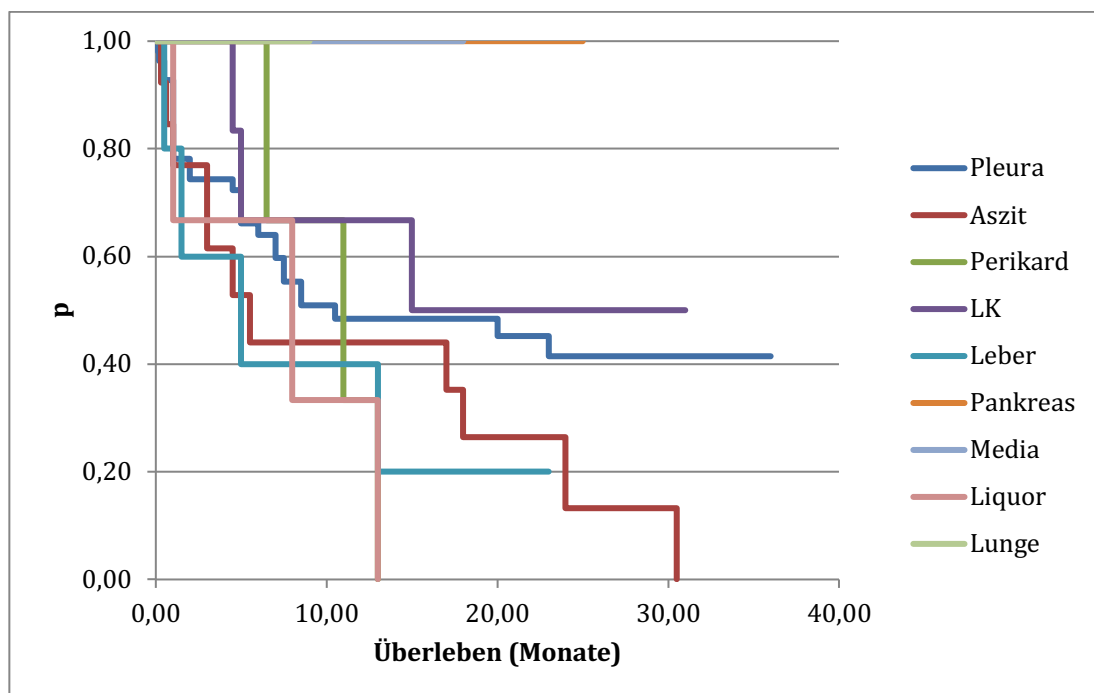


Abb. 19: Überlebenskurven in Bezug zur Entnahmelokalisation für 88 Fälle von Mammakarzinomen

In Tab. 16 und Abb. 20 sind die Datenverteilung und die Überlebenskurven für die Entnahmelokalisation Pleura versus Peritoneum mit Perikard für die 79 Proben von Patienten mit Mammakarzinomen wiedergegeben. Bei den Pleurakarzinosen zeigt sich eine Tendenz zum längeren Überleben. Statistisch signifikant sind die Unterschiede jedoch nicht ($p > 0,05$).

Entnahmelokalisation	Pleura	Peritoneum / Perikard
Patientenzahl	52	27
davon verstorben	31	18
mittl. Überleben (Monate)	17,2	11,3
6-Monate-ÜLW (%)	60,3	54,2
12-Monate-ÜLW (%)	48,8	31,6
24-Monate-ÜLW (%)	36,0	26,4

Tab. 16: Überleben in Beziehung zur Entnahmelokalisation für 79 Patienten von Erguskarzinosen von Mammakarzinomen. $p = 0,3358$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,2813$ (Breslow)

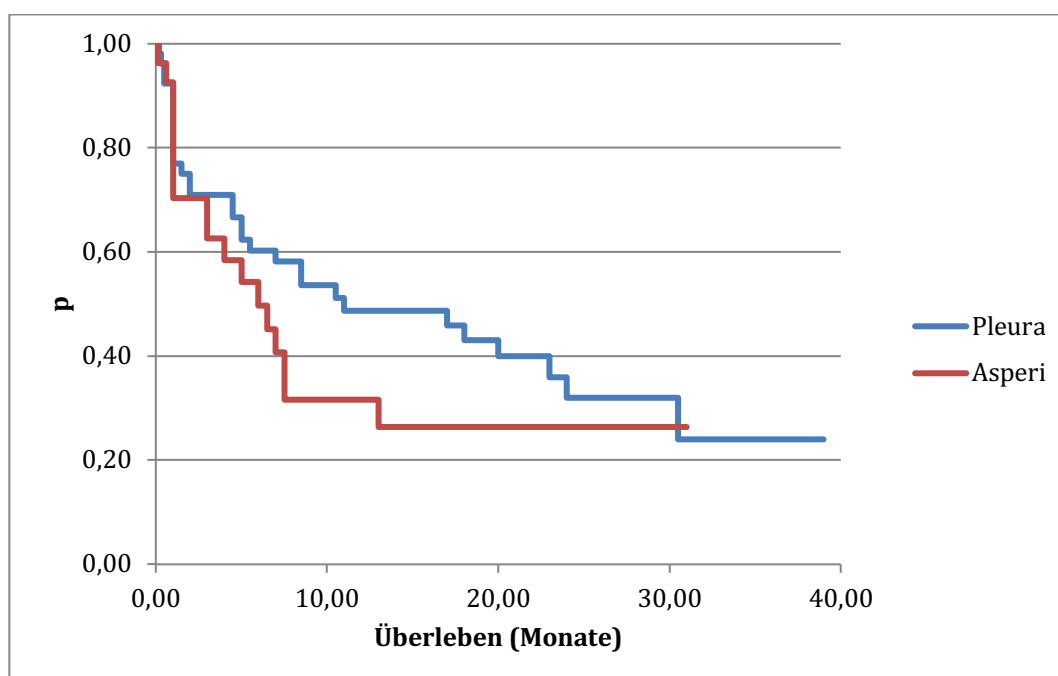


Abb. 20: Überlebenskurven in Bezug zur Entnahmelokalisation für 79 Fälle von Erguskarzinosen von Mammakarzinomen

3.3.3 HER-2-neu-Status (Quotienten-bezogene klassische Auswertung)

Tabelle 17 und Abbildung 21 zeigen, dass auch für metastasierte Mammakarzinome dem klassisch bestimmten HER-2/neu-Status in unserem Patientenkollektiv keine prognostische Bedeutung zukommt, da sich fast gleiche Kennzahlen ermitteln ließen ($p > 0,05$).

LCRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	63	25
davon verstorben	37	15
mittl. Überleben (Monate)	16,5	14,5
6-Monate-ÜLW (%)	62,0	67,6
12-Monate-ÜLW (%)	49,0	49,5
24-Monate-ÜLW (%)	37,0	33,0

Tab. 17: Überleben in Beziehung zum klassisch ausgewerteten HER-2/neu-Status für 88 Patienten mit Mammakarzinom. $p = 0,9873$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,9756$ (Breslow)

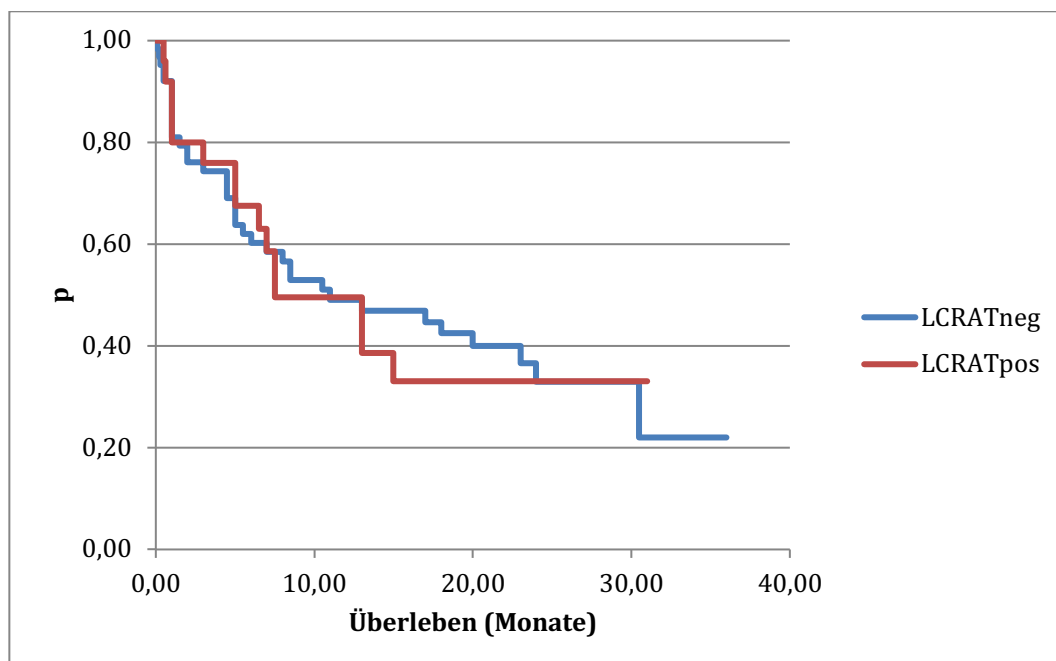


Abb. 21: Überlebenskurven zum klassisch ausgewerteten HER-2/neu-Status für 88 Patienten mit Mammakarzinom

Ähnliche Datenverteilungen in der entsprechenden Tabelle 18 und gleichartige Überlebenskurven (Abbildung 22) ergaben sich auch für die 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose durch ein Mammakarzinom als größter Untergruppe der Studie überhaupt ($p = 0,9615$ bzw. $p = 0,8521$).

LCRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	44	11
davon verstorben	22	6
mittl. Überleben (Monate)	18,6	15,8
6-Monate-ÜLW (%)	64,3	72,7
12-Monate-ÜLW (%)	50,3	41,6
24-Monate-ÜLW (%)	41,0	41,6

Tab. 18: Überleben in Beziehung zum klassisch ausgewerteten HER-2/neu-Status für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom. $p = 0,9873$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,9756$ (Breslow)

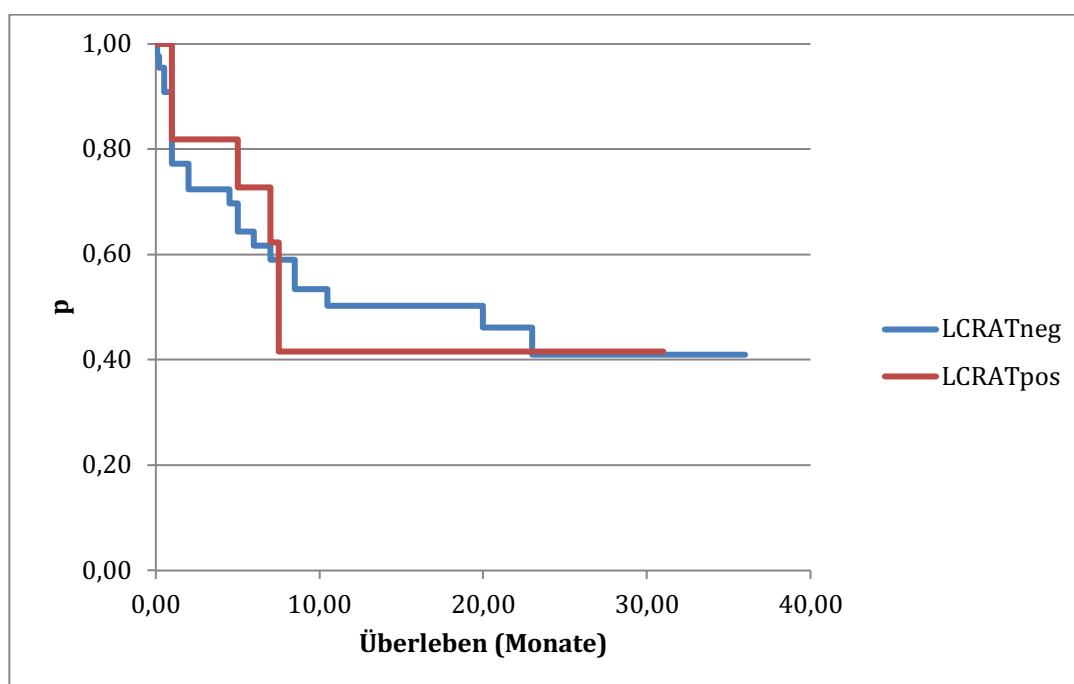


Abb. 22: Überlebenskurven zum klassisch ausgewerteten HER-2/neu-Status für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom

3.3.4 HER-2-neu-Status (Signal-bezogene modifizierte Auswertung)

Tabelle 19 und Abbildung 23 lassen erkennen, dass auch die Signal-bezogene modifizierte Auswertung des HER-2/neu-Status bei metastasierten Mammakarzinomen nicht prognostisch zwischen den beiden Gruppen trennen kann ($p = 0,9027$ bzw. $p = 0,5764$).

LZRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	61	27
davon verstorben	36	16
mittl. Überleben (Monate)	16,5	14,2
6-Monate-ÜLW (%)	64,1	62,4
12-Monate-ÜLW (%)	50,7	45,7
24-Monate-ÜLW (%)	35,5	35,6

Tab. 19: Überleben in Beziehung zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für 88 Patienten mit Mammakarzinom. $p = 0,9027$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,5764$ (Breslow)

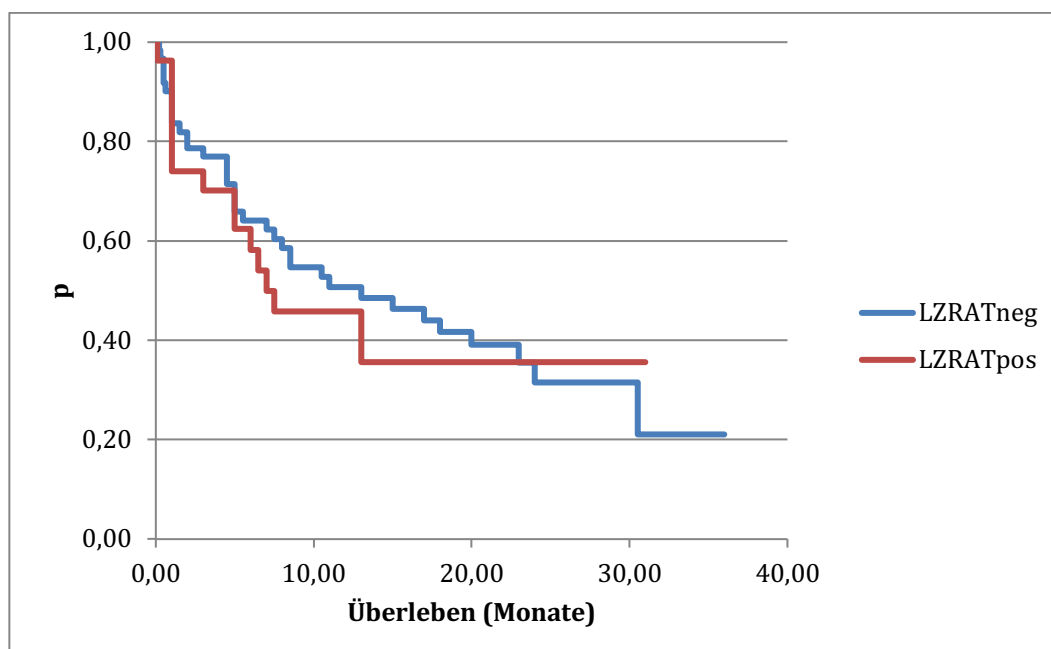


Abb. 23: Überlebenskurven zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für 88 Patienten mit Mammakarzinom

Die Datenverteilungen und die Überlebenskurven (Tabelle 20 und Abbildung 24) für die 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose durch ein Mammakarzinom sind im Folgenden dargestellt. Dabei ergab sich eine zwar bessere Trennung als für die Quotienten-basierte HER-2/neu-Auswertung (siehe Abb. 22), die Ergebnisse waren aber auch hier nicht statistisch signifikant ($p = 0,3249$ bzw. $p = 0,1929$).

LZRAT	negativ	positiv
Patientenzahl	38	17
davon verstorben	18	10
mittl. Überleben (Monate)	19,7	13,4
6-Monate-ÜLW (%)	69,7	58,2
12-Monate-ÜLW (%)	53,6	36,4
24-Monate-ÜLW (%)	42,6	36,4

Tab. 20: Überleben in Beziehung zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom $p = 0,3249$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,1929$ (Breslow)

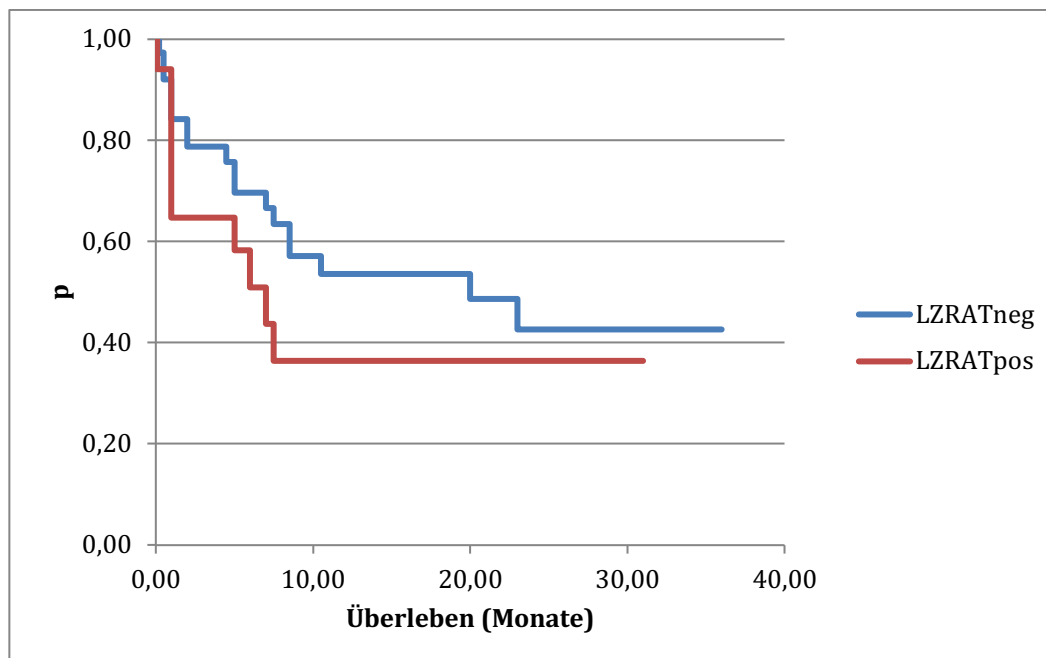


Abb. 24: Überlebenskurven zur Signal-bezogenen modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom.

3.3.5 HER-2-neu-Status (Auswertung gemäß ASCO)

Tabelle 21 und Abbildung 25 geben die Ergebnisse der Auswertung gemäß den ASCO-Vorgaben wieder. Im Vergleich beider Gruppen zeigt sich kein klinisch verwertbarer Trend zugunsten einer der beiden Gruppen; die Unterschiede im Überleben sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,5079$ bzw. $p = 0,2765$).

HER-2/neu gemäß ASCO	negativ	positiv
Patientenzahl	54	34
davon verstorben	31	21
mittl. Überleben (Monate)	17,2	13,5
6-Monate-ÜLW (%)	65,2	61,0
12-Monate-ÜLW (%)	52,3	44,0
24-Monate-ÜLW (%)	37,5	32,0

Tab. 21: Überleben in Beziehung zur modifizierten Auswertung des HER2-neu/Status gemäß ASCO für 88 Patienten mit Mammakarzinom. $p = 0,5079$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,2765$ (Breslow)

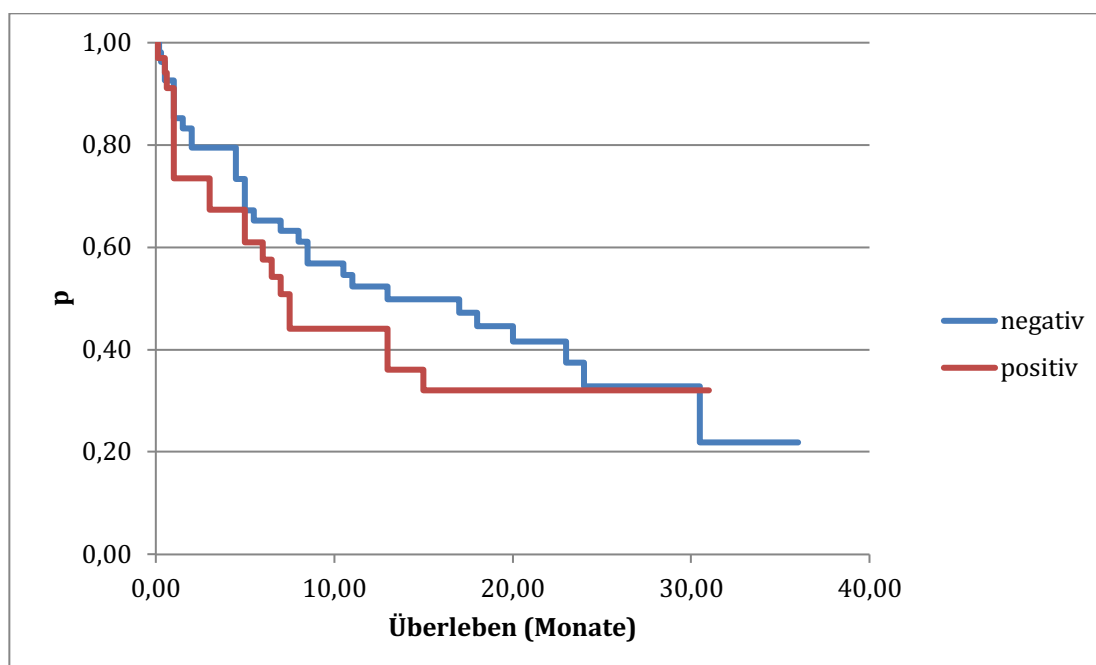


Abb. 25: Überlebenskurven zur modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status gemäß ASCO für 88 Patienten mit Mammakarzinom

In Tabelle 22 und Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Auswertung gemäß den ASCO-Vorgaben bezogen auf die 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom zusammengestellt. Im Vergleich beider Gruppen ergibt sich hier ein Trend zugunsten der HER-2/neu-negativen Fälle, der aber nicht statistisch signifikant ist ($p = 0,4434$ bzw. $p = 0,3138$).

HER-2/neu gemäß ASCO	negativ	positiv
Patientenzahl	36	19
davon verstorben	17	11
mittl. Überleben (Monate)	19,6	14,0
6-Monate-ÜLW (%)	67,9	62,7
12-Monate-ÜLW (%)	54,0	37,6
24-Monate-ÜLW (%)	41,7	37,6

Tab. 22: Überleben in Beziehung zur modifizierten Auswertung des HER2-neu-Status gemäß ASCO für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom. $p = 0,4434$ (Mantel-Cox) bzw. $p = 0,3138$ (Breslow)

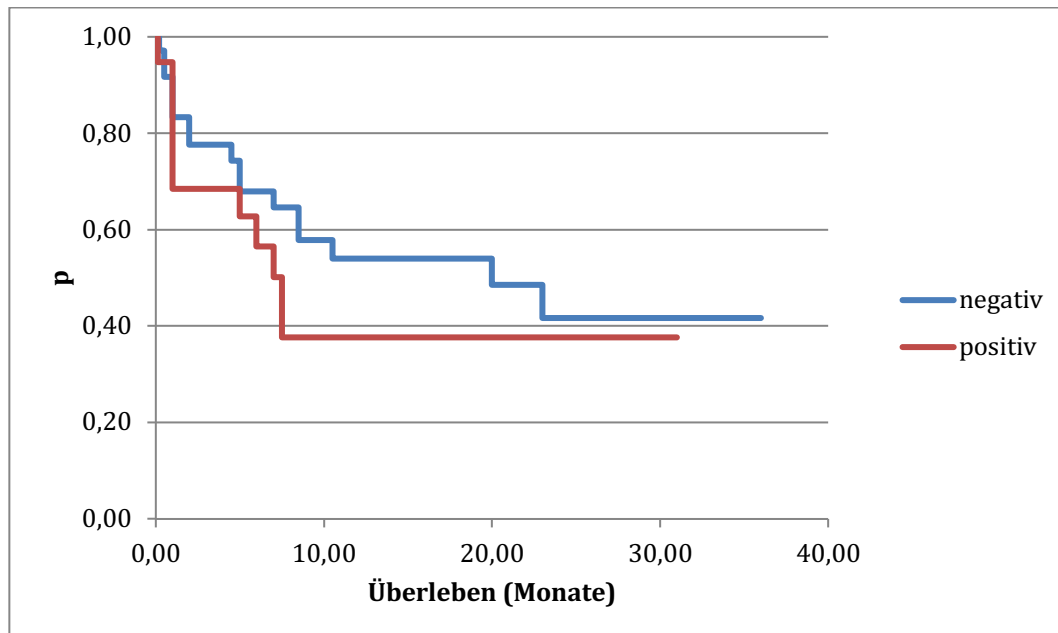


Abb. 26: Überlebenskurven zur modifizierten Auswertung des HER-2/neu-Status gemäß ASCO für 55 Patientinnen mit einer Pleurakarzinose bei Mammakarzinom.

4. Diskussion

Der HER-2/neu Status ist insbesondere bei Mammakarzinomen und bei metastasierten Magenkarzinomen zu einem der wichtigsten Faktoren im Hinblick auf adjuvante Therapieentscheidungen avanciert. Seine Bedeutung liegt darin, dass nur bei positivem HER-2/neu-Status eine adjuvante Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab medizinisch als sinnvoll und damit indiziert angesehen wird. Die Bindungsfähigkeit von Trastuzumab an Tumorzellen setzt nämlich das Vorhandensein einer extrazellulären Domäne von HER-2/neu an der Zellmembran der Tumorzellen voraus, welche wiederum zuvor am Tumormaterial mit den oben beschriebenen Methoden getestet wird (Onko-Internetportal der Deutschen Krebsgesellschaft 2019).

Hinzu kommt, dass Trastuzumab-Therapien mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen können, so dass sich eine Gabe "auf Verdacht" im Grunde verbietet. In der aktuellen Fachinformation der Firma Roche (Roche 2019), dem früher einzigen und heute noch bedeutendsten Anbieter von Trastuzumab (dort unter dem Handelsnamen Herceptin)³, werden als "sehr häufige Nebenwirkungen"⁴ Infektionen, Nasopharyngitis, Neutropenie und febrile Neutropenie, Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Gewichtsverlust und Anorexie, Schlaflosigkeit, Tremor, Schwindelgefühl, Kopfschmerzen, Parästhesien, Geschmacksstörungen, Konjunktivitis und vermehrte Tränensekretion genannt, ferner 21 "häufige Nebenwirkungen", darunter neutropenische Sepsis, Überempfindlichkeitsreaktionen, periphere Neuropathie, Somnolenz und Ataxie. Insgesamt unterstreicht das Nebenwirkungsprofil, dass es einer exakten Indikationsstellung für die Gabe von Trastuzumab als Monotherapie (oder in Studien auch als Kombinationstherapie mit Paclitaxel oder Docetaxel) bedarf.

³ Seit April 2018 sind zu Herceptin analoge Trastuzumab-Zubereitungen, sogenannte *Biosimilars*, erhältlich, die unter den Handelsnamen Trazimera, Herzuma, Kanjinti, Ogivri bzw. Ontruzant angeboten werden und etwa 8% - 10% billiger als Herceptin angeboten werden.

⁴ Definitionsgemäß betreffen "sehr häufige Nebenwirkungen" $\geq 10\%$ der Patienten und "häufige Nebenwirkungen" 1-10% der Patienten, denen ein Medikament appliziert wird.

Ist die tumorbiologische Eignung auf der Basis eines positiven HER-2/neu-Status erbracht, so steht bei Mammakarzinomen eine adjuvante Trastuzumab-Therapie prinzipiell Patientinnen aller Stadien offen; bei Magenkarzinomen ist die Zulassung auf inoperable oder metastasierte Fälle gemäß den Ergebnissen der ToGA-Studie (Bang et al. 2012) beschränkt.

Bei der grundlegenden Bedeutung der HER-2/neu-Bestimmung ist wesentlich, methodische Aspekte zu bedenken. Dieses soll im Folgenden versucht werden, wobei es zum einen um verschiedene Methoden zur HER-2/neu-Bestimmung (Immunhistochemie vs. FISH), zum anderen um zur Untersuchung geeignete Materialien (Zytologie vs. Histologie) sowie um die verschiedenen Auswertemodi (klassisch vs. ASCO-Modifikation) gehen soll. Nicht eingegangen werden kann im Rahmen dieser Arbeit auf Aspekte der Reproduzierbarkeit und der Repräsentativität der Untersuchung sowie auf das Problemfeld der Rezeptorkonversion.

4.1 Indikationen zur Bestimmung des HER-2/neu-Status an Metastasen

Die in dieser Arbeit berücksichtigten FISH-Untersuchungen wurde nicht an Primärtumoren, sondern an metastatischen Absiedlungen durchgeführt, überwiegend an Körperhöhlenergüssen, aber auch an soliden Punktaten. Deshalb soll am Anfang der Diskussion auf die Notwendigkeit bzw. Indikation solcher Untersuchungen eingegangen werden.

Für das Mammakarzinom ist heute Konsens, dass alle Primärtumoren auf ihren HER-2/neu-Status getestet werden sollen. Ferner wird empfohlen, dass auch Metastasen ebenfalls auf den HER-2/neu-Status untersucht werden. Dabei bleiben in der Praxis allerdings synchrone Lymphknotenmetastasen der Axilla in aller Regel unberücksichtigt, ohne dass dieses in den Leitlinien explizit so angegeben wäre. Auch Fernmetastasen, die synchron zum Primärtumor aufgefunden werden, werden nicht überall systematisch untersucht. Die Empfehlungen der *European Group on Tumor Markers* (EGTM) (Duffy et al. 2017) gehen über diese Vorgehensweise hinaus und empfehlen insbesondere,

bei diskrepanten Ergebnissen demjenigen der Metastase zu folgen. In der aktuellen Empfehlung steht:

"(...) Where feasible, [HER-2/neu] measurement should also be performed on any metastatic lesion. According to ASCO, if discordance exists between the two locations, the HER2 status of the metastatic site should be used in determining the management. The ABC Consensus Guidelines and NCCN, however, state that if any biopsy is positive, the patients should receive anti-HER2 therapy. As with ER and PR, the recommendation to measure HER2 on a metastatic lesion is not evidence based. However, like ER and PR, the HER2 status can vary between a primary and metastatic site. (...)"

Die Empfehlung fasst aus unserer Sicht alle Aspekte noch einmal gut zusammen: Die Untersuchung an Metastasen "should be performed", ist also eine Soll-Bestimmung, müsste aber andererseits, wenn "any metastatic lesion" analysiert werden soll, auch axilläre Lymphknotenmetastasen und synchrone Fernmetastasen berücksichtigen, gerade weil Diskordanzen beim HER-2/neu-Status durchaus gegeben und bekannt sind. Andererseits seien solche Untersuchungen nicht "evidence based". Zusammenfassend liegt hier also eine vielschichtigere Problematik vor, als man zunächst ahnt. Die aktuelle S3-Leitlinie für Mammakarzinome (2019) geht auf die Thematik synchroner Metastasen nicht konkret ein; für metachrone Metastasen wird eine Empfehlung zu einer Her-2/neu-Diagnostik ausgesprochen.

Beim Magenkarzinom ist die Sachlage auf den ersten Blick einfacher. Am Primärtumor werden HER-2/neu-Bestimmungen in der Routinebefundung zunächst nicht vorgenommen, weil eine therapeutische Option nur bei metastasierten Fällen in der Palliativsituation besteht. Bei diesen wiederum ist die Indikation zum Erheben des HER-2/neu-Status automatisch gestellt, wobei aber die Frage, ob sich die Untersuchung auf den früheren (oder synchronen) Primärtumor oder auf die Metastase erstrecken soll, wohl ungeklärt ist. Die aktuelle S3-Leitlinie für Magenkarzinome gibt hierzu keine definitive Empfehlung.

4.2 Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Komplementäre Verfahren in der HER-2/neu-Diagnostik

Vergleicht man Ergebnisse zur HER-2/neu-Diagnostik mit Immunhistochemie und FISH, so lässt sich eine zahlenmäßig hohe Konkordanz der Ergebnisse darstellen. Dieses darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass jeder diskrepante Fall prinzipiell zu einer falschen Therapieentscheidung führen kann.

Mammakarzinom

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2014 (Bahreini et al. 2014) wurden Ergebnisse von 48 Studien zusammengestellt (Tabelle 23).

Immunhistochemie	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		Fallzahl	Diskordanz
	negativ	positiv		
0 / 1+ (negativ)	3823	135	3958	3,4%
2+ (unklar)	953	393	1346	---
3+ (positiv)	26	1299	1325	2,0%

Tab 23.: Meta-Analyse der Korrelation von immunhistochemischen Ergebnissen und von FISH-Ergebnissen für die HER-2/neu-Bestimmung von 6.629 Fällen von Mammakarzinomen, modifiziert nach Bahreini et al. (2014). Anteil FISH-amplifizierter Fälle in der unklaren immunhistochemischen Gruppe (2+): 29,2%

Die Ergebnisse der Meta-Analyse belegen, dass die Risiken, die man eingeht, wenn man bei einer negativen (0 / 1+) bzw. positiven (3+) Immunhistochemie auf die FISH-Analyse verzichtet, relativ gering bleiben. Insbesondere die Zahl der Patientinnen, die übertherapiert würden, ist mit 2,0% als wohl noch akzeptabel gering anzusehen - auch wenn man sich im Einzelfall das oben ausgeführte Nebenwirkungsprofil des Trastuzumab als Menetekel vor Augen führen muss. Die Zahl der Patientinnen, denen man eine für sie geeignete Therapie im Zweifel vorenthielte, ist mit 3,4% schon deutlich höher. Letztendlich erscheint aber bei der Fülle der Fälle, die immunhistochemisch negativ sind, unrealistisch, hier ergänzende FISH-Untersuchungen zu empfehlen - dann könnte man bei der großen Zahl negativer Fälle die Immunhistochemie als Methode direkt verlassen

und sie durch die wesentlich aufwendigere und teurere FISH-Untersuchung ersetzen. Die Datenverteilung in Tab. 23 darf nämlich nicht so gelesen werden, als ob HER-2/neu-negative und HER-2/neu-positive Fälle im klinischen Alltag wirklich nur im Verhältnis 3:1 aufträten, wie es die Zahlen der Meta-Analyse nahelegen könnten (3958 : 1325). Epidemiologische Untersuchungen weisen wesentlich höhere Zahlen negativer Fälle im Verhältnis von 6,5:1 auf. Aktuelle Zahlen aus den USA für die Jahre 2012-2016 beispielsweise zeigten eine HER-2/neu-Positivität in 15,3% der Tumoren (162.993 / 1.064.055), die übrigen waren negativ (de Santis et al. 2019).

Dass sich bei "klaren" Fällen, die immunhistochemisch als 0 / 1+ bzw. als 3+ eingestuft worden waren, bei einer FISH-Analyse im Mittel hohe Konkordanzwerte belegen lassen, zeigen auch viele kleinere Einzelstudien (Tabelle 24); hier ergibt sich für 1.110 Fälle eine Konkordanz von 92,6%.

Erstautor	Jahr	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		Konkordanz
		positiv bei IHC-Score 3+	negativ bei IHC-Score 0 / 1+	
Kakar	2000	14/15	78/80	96,8%
Pauletti	2000	29/37	5/5	81,0%
Tsuda	2001	30/35	160/161	96,9%
Tubbs	2001	21/26	88/95	90,1%
Dolan	2005	5/5	23/31	77,8%
Prati	2005	22/27	129/136	92,6%
Kuo	2007	15/15	21/24	92,3%
Apple	2009	18/28	189/192	90,5%
Panjwani	2010	77/84	49/52	92,6%
Goud	2012	25/32	30/30	88,7%
Gesamt		256/304	772/806	92,6%

Tab. 24: Gegenüberstellung der HER-2/neu-Diagnostik beim Mammakarzinom durch Immunhistochemie und FISH-Analyse von 1.110 Fällen. Berücksichtigt wurden ausschließlich immunhistochemisch als 0, 1+ (jeweils negativ) oder 3+ (positiv) bewertete Fälle.

Einzelstudien beim Mammakarzinom an Fällen mit einem immunhistochemischen Resultat von 2+ wiesen bei der FISH-Untersuchung recht unterschiedliche Amplifikationsraten auf (Tabelle 25), die sich in ihren Extrema (7,5% bzw. 87,0%) nicht schlüssig erklären lassen. Im Mittel bzw. im Median allerdings ergibt sich eine Amplifikationsrate in ca. einem Viertel der Fälle (23,8% bzw. 26,5%, siehe Tabellenlegende), die wiederum sowohl dem Mittelwert der obigen Meta-Analyse bei Mammakarzinomen (29,2%), als auch den unten genannten gemittelten Werten für das Magenkarzinom (24,8%) in etwa gleicht.

Erstautor	Jahr	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		Amplifikationsrate
		positiv	negativ	
Kakar	2000	6	11	35,3%
Ridolfi	2000	14	24	36,8%
Tsuda	2001	5	14	26,3%
Tubbs	2001	3	21	12,5%
Lal	2004	83	230	26,5%
Yaziji	2004	196	965	16,9%
Dolan	2005	7	86	7,5%
Dybdal	2005	21	67	23,9%
Lan	2005	96	120	44,4%
Prati	2005	9	26	25,7%
Kuo	2005	8	7	53,3%
Apple	2009	12	28	30,0%
Panjwani(*)	2010	24	11	68,6%
Goud (**)	2012	20	3	87,0%
Gesamt		504	1613	23,8%

Tab. 25: Einzelstudien zur HER-2/neu-Diagnostik beim Mammakarzinom durch FISH-Analyse von 2.117 histologischen Fällen mit einem immunhistochemischen Score 2+. "Pos. Fälle" umfassen gemäß FISH-Vorgaben amplifizierte Fälle, "neg. Fälle" nicht amplifizierte Fälle. Nicht berücksichtigt wurden vier (*) bzw. fünf (**) Fälle, in denen das FISH-Ergebnis als unklar ("*equivocal*") interpretiert wurde. Amplifikationsrate: 23,8%.

In der Tabelle nicht berücksichtigt wurde eine große Studie von Gown et al. (2008), in der bei 529 von 4.148 Fällen (14,6%) mit einem Score von 2+ eine HER-2/neu-Amplifikation per FISH nachgewiesen wurde. Der Anteil von Bewertungen als 2+, bezogen auf die Gesamtzahl der zur Verfügung stehenden 16.141 konsekutiven Fälle von Mammakarzinomen, ist aber mit 25,7% unverhältnismäßig hoch, so dass hier Zweifel an einer korrekten Anwendung des immunhistochemischen Scores bestehen. Die eher geringe Amplifikationsrate könnte die Überlegung unterstützen, dass hier eine Reihe von Fällen als 2+ bewertet worden sein könnten, die eigentlich in die Gruppe 0 / 1+ gehörten.

Auch eine Arbeit aus Zürich mit einem eher diametralen Ergebnis wurde in die Tabelle nicht mit aufgenommen (Varga et al. 2013). Sie stellt an 1.522 konsekutiven Fällen von Mammakarzinomen in etwa das Optimum dessen dar, was man in der HER-2/neu-Immunhistochemie an Spezifität erreichen kann: Von 934 negativen Fällen (Score 0 / 1+) waren ganze 6 FISH-amplifiziert (0,6%), von 404 Fällen mit Score 2+ waren es 20 (5,0%). Allerdings waren andererseits von den 184 Fällen mit Score 3+ nur 155 amplifiziert (84,2%), so dass die Sensitivität viel niedriger als in anderen Studien war. Bezogen auf alle Patientinnen betrug die Amplifikationsrate nur 11,9% (181/1522).

Abschließend sollte noch eine Arbeit erwähnt werden, die einen ungewöhnlichen Vergleich getätigt hat, nämlich zwischen histologisch untersuchten primären Mammakarzinomen im Vergleich mit in Zellblöcken untersuchten zytologischen Aspiraten von Metastasen (Shabaik et al. 2010). Dabei ergab sich in 38 von 40 Fällen⁵ ein gleichartiges Ergebnis (35 Negative, 3 Positive); in jeweils einem Fall war die Kombination (3+ / 2+) bzw. (2+ / 3+) vergeben worden. Die Konkordanz der Untersuchungen lag entsprechend bei mindestens 95%. Sporadisch waren auch FISH-Ergebnisse angegeben, die aber nicht ausgewertet werden konnten, da sie nur für acht der 80 Untersuchungen vorlagen. Die beiden immunzytochemisch als 2+ beurteilten Präparate wurden dabei nicht per FISH nachuntersucht.

⁵ Die Ergebnisse wurden aus den in der Arbeit aufgelisteten Rohdaten selbst extrahiert; in der Publikation kommen sie nicht klar heraus.

Magenkarzinom

Bei Magenkarzinomen gibt es offenbar nur eine größere Vergleichsstudie zur allgemeinen Vergleichbarkeit von Immunhistochemie und FISH (Silva et al. 2016). Basierend auf 100 primären Magenkarzinomen zeigte sich eine sehr hohe Korrelation beider Methoden (Tabelle 26). Für die Fälle, die immunhistochemisch als "klar", also als 0, 1+ oder 3+ klassifiziert wurden, beträgt die Konkordanz mindestens 97,9% (94/96, siehe Tabellenlegende); von den vier als 2+ klassifizierten Fällen waren zwei amplifiziert und zwei nicht.

Immunhistochemie	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		Fallzahl	Diskordanz
	negativ	positiv		
0 / 1+ (negativ)	84	(2)	86	(2,3%)
2+ (unklar)	2	2	4	---
3+ (positiv)	0	10	10	0,0%

Tab 26: Analyse der Korrelation von immunhistochemischen Ergebnissen und von FISH-Ergebnissen für die HER-2/neu-Bestimmung von 100 Fällen von Magenkarzinomen, modifiziert nach Silva et al. (2017). Die beiden in Klammern gesetzten Fälle wurden in der FISH-Untersuchung als "*equivocal*" interpretiert.

In vier weiteren, kleineren Arbeiten waren 29 von insgesamt 65 Fällen FISH-positiv und die Amplifikationsrate entsprechend höher (44,6%) (Yano et al. 2006, Yan et al. 2011, He et al. 2013, Chen et al. 2014). Fasst man alle fünf Arbeiten zusammen, so berechnet sich die Amplifikationsrate mit 24,8% (41/165), so dass beim Magenkarzinom die Amplifikationsraten mit denen des Mammakarzinoms vergleichbar sind. Eine weitere Arbeit untersuchte speziell eine große Zahl von Fällen mit einem immunhistochemischen Ergebnis von 2+ (Liu et al. 2016). Dabei erwiesen sich 17 von 122 untersuchten Fällen (13,9%) in der FISH-Untersuchung als amplifiziert.

Zusammenfassend darf man also eine sehr gute Vergleichbarkeit beider Methoden bei immunhistochemischen Ergebnissen von 0, 1+ und 3+ als gesichert ansehen; die als obligatorisch angesehene FISH-Untersuchung in Fällen einer immunhistochemischen Zuordnung zu 2+ ist nach heutigem Wissensstand auch bei Magenkarzinomen in der Tat notwendig.

Außerdem wäre noch eine Arbeit an Magenkarzinomen zu erwähnen, die sich mit Primärtumoren im Vergleich zu Metastasen befasst (Bozzetti et al. 2011). Die Autoren gehen dabei sowohl auf den Vergleich beider Methoden an 68 Primärtumoren, als auch an 39 histologisch gesicherten synchronen bzw. metachronen Fernmetastasen ein. Innerhalb der Primärtumoren war ein einziger von 52 immunhistochemisch als negativ eingestuft (0, 1+) in der FISH-Analyse amplifiziert (1,9%), alle sieben immunhistochemisch positiven Fälle waren auch amplifiziert. Bei den 39 Fernmetastasen waren 22 mit beiden Methoden positiv und 7 mit beiden Methoden negativ, hier ergaben sich bei immunhistochemisch klaren Fällen also keine Diskrepanzen. Höher als man dieses von Mammakarzinomen kennt, waren bei den Magenkarzinomen die Fallzahl für die immunhistochemische Gruppe 2+, nämlich 9 bei den Primärtumoren (13,2%) und 10 bei den Fernmetastasen (25,6%). Die FISH-basierten Amplifikationsraten wiederum hielten sich dann wieder im gewohnten Rahmen; von den 9 Primärtumoren waren zwei amplifiziert (22,2%), von den 10 Metastasen eine (10,0%). In den 29 Fällen, die im Vergleich oben nicht berücksichtigt wurden, lagen zytologisch gesicherte Metastasen vor (siehe Kap. 4.3), die in der Studie unter dem Vergleichsaspekt Immunhistochemie versus FISH aber nicht weiter analysiert wurden.

4.3 Histologie und Zytologie: Komplementäre Materialien für die HER-2/neu-Analyse

Histologische und zytologische Verfahren stehen aus morphologischer Sicht zueinander nicht in Konkurrenz, sondern sind als komplementäre Verfahren zu sehen. Da insbesondere in Deutschland nur in wenigen Zentren eine besondere zytologische Expertise besteht, werden hier histologische Verfahren zur Diagnosestellung von malignen Tumoren bevorzugt. Dafür mag es auch viele

gute Argumente geben - dennoch hat die Zytologie sowohl methodische, als auch inhaltlich gut begründete Domänen bzw. Anwendungsfelder, auf denen sie der Histologie mindestens gleichwertig ist.

Dieses gilt im Besonderen für das Feld der Diagnostik von Veränderungen der serösen Höhlen, aus denen die meisten der Präparate unserer Studie stammen. Sofern punktionsfähige Flüssigkeitsmengen in den serösen Höhlen zur Verfügung stehen, macht es Sinn, diese zur zytologischen Diagnostik zu aspirieren. Dieses ist einfacher und komplikationsloser, als eine thorakoskopische oder laparoskopische Biopsieentnahme durchzuführen und ist ferner eine Methodik, die auch der Inneren Medizin oder der Gynäkologie etc. ohne die Einschaltung chirurgischer Fachdisziplinen und ohne Vollnarkose der Patienten zur Verfügung steht.

Bezogen auf immunhistochemische oder FISH-Verfahren bestehen aus der Erfahrung zwischen Histologie und Zytologie methodische Unterschiede, deren Relevanz eigentlich an vergleichenden Untersuchungen bestimmt werden müsste. Dies gilt für das Themenfeld der HER-2/neu-Bestimmungen deswegen im Besonderen, weil sowohl die immunhistochemische, als auch (zumindest weitgehend) die FISH-basierte Untersuchung streng genommen nur für die Histologie validiert sind und somit Untersuchungen an Zytologie unter der Begründungsnotwendigkeit einer gleichartigen Aussagekraft stehen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Methoden geht darauf zurück, dass bei der Histologie keine Zellen, sondern Schnitte von Zellen vorliegen, so dass z.B. die Zellmembran und die Kernmembran bereits eröffnet sind. Bei der Zytologie hingegen werden unbeschädigte komplette Zellen untersucht. Beides kann Vor- und Nachteile für die Penetration von Fixantien, Laborchemikalien oder Antikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen in die jeweiligen Zellkompartimente, die man darstellen möchte, mit sich bringen. Setzt man zytologische Aspireate, statt sie auszustreichen, in sogenannte Zellblöcke um, lässt sich dieses methodische Problem insofern lösen, als von den Zellblöcken wiederum histologische Schnittpräparate gewonnen werden.

Ein weiterer wichtiger und nicht zu lösender Punkt ist, dass bei der Histologie die Zellen in größeren Verbänden dargestellt werden, während sie bei der Zytologie einzeln oder in oft nur kleinen Clustern vorliegen. Außerdem ist keine Beurteilung des Verhaltens der zu untersuchenden Zellen gegenüber dem Stroma möglich, da dieses bei zytologischen Entnahmen (Punktate, Bürstungen etc.) nicht mit abgetragen wird. An diesem Problem ändern auch Zellblöcke letztendlich nichts.

Außerdem muss bedacht werden, dass auch die Vorbehandlung der Materialien Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hat. Sowohl eine zu kurze (Problem der Autolyse), als auch eine zu lange (Problem der Überfixation) Formalinfixation ist geeignet, Untersuchungen an Histologiepräparaten zu erschweren bzw. sie falsch negativ werden zu lassen. Ähnlich gilt auch, dass zytologische Proben in verschiedenen Medien fixiert werden können (50% Äthanol, Saccomanno-Fixativ, Spezial-Medien für Dünnschichtzytologie) und diese ggfls. auch zu besseren oder schlechteren Ergebnissen in der HER-2/neu-Analyse führen (Fetsch und Abati 2007, Williams et al. 2009). Da in unserer Arbeit aber kein direkter Vergleich zur Histologie gezogen wird, soll dieses Feld nicht weiter diskutiert werden.

Für die HER-2/neu-Bestimmung liegen nur wenige vergleichende Untersuchungen am identischen Zellmaterial vor. Über Vergleiche zwischen Operationspräparaten (Histologie) mit Abklatschzytologien von der Tumoroberfläche vor der Fixation ist nichts aus der Literatur bekannt. Stattdessen gehen die Studien auf Vergleiche zwischen Punktionen von Mammaläsionen und späteren Stanzbiopsien oder Tumorresektaten zurück.

Immunzytochemie / Immunhistochemie

Insgesamt gibt es fünf Arbeiten, in denen Vergleiche zwischen Immunhistochemie und Immunzytochemie für HER-2/neu angestellt worden sind. Allesamt wurden sie an Präparaten von Mammakarzinomen durchgeführt; für Magenkarzinome liegen keine entsprechenden Studien vor (Tabelle 27).

Erstautor	Jahr	Immunzytochemie		Konkordanz mit Immunhistochemie
		positiv	negativ	
Nizzoli	2003	10	28	84,2%
Beatty	2004	8	40	85,4%
Moriki	2004	30	80	100%
Dong	2016	28	37	86,2%
Geethamala	2017	25	67	89,1%
Gesamt		101	252	90,9%

Tab. 27: Immunzytochemische HER-2/neu-Diagnostik beim Mammakarzinom an zytologischen Proben von 353 Fällen; die Angaben zur Konkordanz beziehen sich auf die Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Immunhistochemie an histologischen Proben. Fälle mit Score 2+ wurden hier Quellen-bedingt als positiv gewertet; Näheres siehe Text.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass in den Arbeiten von Beatty et al. (2004) und Moriki et al. (2004) alle Fälle mit einem HER-2/neu-Status mit einem Score von 2+ oder 3+ als positiv gerechnet wurden; bei der Arbeit von Geethamala et al. (2017) ist dieses ebenfalls zu vermuten, geht aber aus dem Text nicht eindeutig hervor. Alle drei Arbeiten geben die Zahl von Fällen mit 2+ bzw. 3+ auch nicht einzeln an. Bei der Arbeit von Nizzoli et al. (2003) liegen die Zahlen hingegen vor. Dabei fällt auf, dass immunzytochemisch acht Fälle als 2+ bewertet wurden, von denen in der Immunhistochemie nur einer als 2+ eingeschätzt wurde; möglicherweise liegt bei dieser älteren Arbeit aus der Frühphase der Befassung mit der HER-2/neu-Immunzytochemie noch eine gewisse interpretatorische Unsicherheit vor. Ebenso wurden bei Dong et al. (2016) entsprechende Werte angegeben. Hier ist die Zahl der Fälle in der Gruppe 2+ mit 23 von 65 (35,4%) ungewöhnlich hoch, wobei 18 Fälle mit beiden Methoden übereinstimmend als 2+ beurteilt wurden. Insgesamt erscheinen beide Anwendungen aber dennoch gut vergleichbar und komplementär anwendbar.

FISH-Analyse an Zytologie / FISH-Analyse an Histologie

Insgesamt drei Arbeiten befassen sich mit dem Vergleich von FISH-Analysen an zytologischem Material und an histologischem Material, jeweils von Mammakarzinomen (Tabelle 28).

Erstautor	Jahr	FISH-Amplifikationsraten der Histologie und der Zytologie				Konkordanz
		+ / +	+ / -	- / +	- / -	
Dong	2016	7	3	0	36	93,5%
Vohra	2016	14	2	2	105	96,7%
Nishimura	2016	13	3 unklare Fälle		82	96,9%
Gesamt		34	5	2	223	96,3%

Tab. 28: FISH-basierte HER-2/neu-Diagnostik beim Mammakarzinom an zytologischen Proben von 223 Fällen im Vergleich zu histologischen Untersuchungen. In die Berechnung der Gesamtkonkordanz gehen die drei unklaren Fälle aus der Arbeit von Nishimura als diskrepant ein (257 / 267; 96,3%).

Die beiden Studien von Dong et al. (2016) und von Vohra et al. (2016) arbeiten mit als Zellblock verarbeiteten Zytologien, in der Arbeit von Nishimura et al. (2016) werden Dünnschichtzytologien verwendet. Die histologischen Materialien stammen aus diagnostischen Stanzbiopsien bzw. aus Resektaten. Bei der Studie von Nishimura ist zu beachten, dass drei Fälle nicht eindeutig klassifizierbar waren: Zwei von ihnen wurden in beiden Untersuchungen als unklar ("*equivocal*") eingestuft, ein dritter Fall, der zytologisch unklar war, erwies sich in der Histologie als nicht amplifiziert.

Bezüglich des Magenkarzinoms liegt nur eine Arbeit vor, die sich auch mit FISH-Untersuchungen an Zytologien befasst. Die oben bereits erwähnte Arbeit von Bozzetti et al. (2011) an 68 Magenkarzinomen und ihren synchronen bzw. metachronen Metastasen schließt nämlich neben 39 histologisch gesicherten Metastasen auch 29 zytologisch diagnostizierte Metastasen ein. Bezogen auf alle 68 Fallpaare (Primärtumor / Metastase) wurden Zahlen zu den Ergebnissen der

FISH-Analyse zu HER-2/neu vorgelegt. Dabei waren 57 Fälle jeweils negativ, 10 Fälle jeweils positiv und nur ein einzelner Fall (1,5%) im Primärtumor negativ und in der Metastase positiv. Hieraus lässt sich ableiten, dass zwischen Histologie und Zytologie offenbar keine wesentlichen Diskrepanzen in der FISH-Analyse von HER-2/neu bei Metastasen von Magenkarzinomen vorliegen.

Zusammenfassend erscheinen FISH-Anwendungen zu HER-2/neu an Histologie und Zytologie so hoch korreliert, dass sie als in ihrer Aussagekraft gleichartig bewertet werden können.

4.4 ASCO-basierte Modifikation des HER-2/neu-Auswertealgorithmus: Ein inzwischen allgemein anerkanntes Auswerteverfahren

Der neue Auswertealgorithmus vom ASCO kann nur zur gleichbleibenden bzw. höheren Zahlen von Fällen führen, die als amplifiziert gewertet werden. Dies liegt daran, dass die bisherige Auswertungsform ihre Gültigkeit behalten hat und somit kein bislang positiver Fall negativ werden kann.

Dadurch, dass die ASCO-Modifikation inzwischen schnelle allgemeine Akzeptanz erfahren hat, ist ebenso schnell auch eine Umdeutung in der Ergebnisbewertung eingetreten. Dies kann man anhand einer Arbeit nachvollziehen, in der 8.068 histologisch untersuchte Fälle von Mammakarzinomen der Universitäten von Stanford, San Francisco (USCF) und Seattle (UWMC) zusammengefasst wurden (Ballard et al. 2017). Dort wird zwischen "*classical amplification*" und "*non-classical amplification*" unterschieden, wobei unter "*classical amplification*" bereits eine Konstellation verstanden wird, bei der sowohl der LSI 17.2 / CEP 17 - Quotient ≥ 2 ist, als auch die durchschnittliche LSI 17.2-Signalzahl bei > 6 liegt, also die ASCO-Modifikation als im Grunde etabliert und bereits "klassisch" angesehen wird. Alle anderen Arten der Amplifikation werden als "*non classical*" definiert, nämlich:

- Monosomie 17: durchschnittliche CEP 17-Signalzahl < 2 , durchschnittliche LSI 17.2-Signalzahl ≤ 4 , aber LSI 17.2 / CEP 17 - Quotient ≥ 2
- geringe HER-2/neu-Amplifizierung: durchschnittliche LSI 17.2 -Signalzahl 4 - 6, LSI 17.2 / CEP 17 - Quotient ≥ 2

- Ko-Amplifikation / Polysomie 17: durchschnittliche LSI 17.2-Signalzahl > 6, LSI 17.2 / CEP 17 - Quotient < 2
- heterogen: amplifizierte Cluster in > 10% des Tumorgewebes, uneinheitliches Gesamtmuster der FISH-Signale

Außerdem wurde eine Gruppe definiert, die als unklar ("*equivocal*") bezeichnet wurde. Stellt man diese Einteilung versuchsweise tabellarisch dar, so lassen sich die möglichen Konstellationen wie folgt wiedergeben (Tabelle 29).

Signalquotient LSI 17.2 / CEP 17	Quotient LSI 17.2-Signale / Tumorzellzahl		
	≤ 4	(> 4) bis (< 6)	≥ 6
< 2	"klassisch negativ"	unklar (" <i>equivocal</i> ")	Ko-Amplifikation / Polysomie 17
≥ 2	Monosomie 17 (bei CEP 17 < 2)	gering amplifiziert	"klassisch positiv"
unbestimmt	heterogenes Färbemuster bei amplifizierten Clustern (> 10% der Tumorzellen)		

Tab. 29: Übertragung der Subspezifizierung der HER-2/neu-FISH-Ergebnisse von Ballard et al. (2017) in eine tabellarische Form. Die **rot** dargestellte Kategorie entspricht derjenigen, die durch die 2013 erfolgte ASCO-Modifikation zusätzlich als positiv gewertet wird. Die **blau** dargestellten Kategorien geben Erläuterungen von Ballard et al. zu bestimmten positiven Ergebniskonstellationen wieder. In **grün** ist die Gruppe der unklaren Befunde wiedergegeben.

Von den über 8.000 Fällen waren 78,8% in der FISH-Untersuchungen negativ, 11,4% "klassisch" amplifiziert und 4,6% "nicht-klassisch" amplifiziert. Die übrigen 5,2% der Fälle waren als unklar eingestuft. Eine in prozentualer Form gegebene Verteilung der ca.⁶ 370 "nicht-klassisch" HER-2/neu-amplifizierten Fälle zeigte, dass in 44,3% der Fälle geringe Amplifikationen zugrunde lagen, in 31,9% eine Monosomie 17, in 17,6% Ko-Amplifikationen bzw. Polysomie 17 und in 6,2% Heterogenität. Da diese Konstellationen mit < 5% insgesamt letztendlich selten sind, wurden von den Autoren der Studie auch konkrete Vorgaben zu er-

⁶ Die Angabe von ca. 370 Fällen ergibt sich aus dem Anteil von 4,6% auf 8.068 Gesamtfälle; in der Publikation sind nur die Fallzahlen genauer spezifiziert, in denen auch klinische und pathologische Daten vorlagen, nämlich 367 Fälle, was dann aber nur 4,5% entspräche. Entsprechend scheinen bei wenigen der Fälle keine ausreichenden klinischen Daten vorhanden gewesen zu sein.

läuternden Kommentaren für die Befundung solcher Fälle gemacht, die den klinischen Kollegen Anhaltspunkte für therapeutische Entscheidungen bieten sollen. Dabei weisen die Autoren wohl vollkommen zurecht darauf hin, dass sich aufgrund der Seltenheit der Veränderungen hier keine generellen Empfehlungen geben lassen werden

"(...) Although additional clinical outcomes data, such as responses to HER2-targeted therapies in these 'non-classical' amplified and equivocal categories, would be ideal, the rarity of these types makes them unlikely to be well-studied in current clinical trial settings. (...)".

Außerdem sind zwei Arbeiten zu erwähnen, in denen Ergebnisse, die nach den früheren Vorgaben gewonnen worden waren, umklassifiziert wurden. Die Studie von Ballard bietet diese Daten leider nicht an.

In die Studie von Long et al. (2015) waren 717 histologische Fälle von Mammakarzinomen eingeschlossen, von denen ursprünglich 621 als negativ beurteilt waren (86,6%), 71 als positiv (9,9%) und 25 als unklar (3,5%). Insgesamt wurden 55 Fälle infolge der ASCO-Modifikation umklassifiziert (7,7%). Dabei wurden 35 negative Ergebnisse als unklar eingeordnet und 1 negatives Ergebnis als positiv. Außerdem wurden 6 unklare Fälle jetzt negativ und 13 unklare Fälle positiv.

Von Bethune et al. (2015) wurden 904 histologische Fälle von Mammakarzinomen reklassifiziert. Vor der ASCO-Modifikation waren 789 FISH-Untersuchungen als negativ eingestuft waren (87,3%), 94 als positiv (10,2%) und 21 als unklar (2,3%). Durch die Modifikation wurden 85 Fälle anders bewertet (9,4%). Von den negativen Fällen wurden jetzt 66 als unklar eingeordnet und 6 negative als positiv. Außerdem wurden 4 unklare Fälle jetzt als negativ und 9 unklare Fälle als positiv bewertet.

Die Daten beider Arbeiten sind insgesamt gut vergleichbar und zeigen, dass die Zahl der Fälle, die von der ASCO-Modifikation betroffen sind, mit < 10% relativ gering bleibt. Wichtig erscheint vor allem, dass (wenn auch sehr selten) sogar zuvor negative Fälle nunmehr als positiv zu interpretieren waren.

4.5 ASCO-basierte Modifikation des HER-2/neu-Auswertalgorithmus: Eigene Daten und klinische Implikationen

Unsere eigenen Daten entsprechen der ersten Darstellung einer rein zytologisch untersuchten Fallgruppe. Insgesamt zeigen unsere eigenen Zahlen, dass sich auch für die Zytologie deutliche Zuwächse an positiv beurteilten Fällen durch die ASCO-Modifikation zeigen. Nach dem alten Auswertemodus hatten sich 76 negative Fälle (71,7%) und 30 positive Fälle (28,3%) ergeben. Durch die ASCO-Modifikation kamen 11 positive Fälle hinzu; bezogen auf die Gesamtzahl der Fälle entspricht dies 10,4% (11/106). Damit liegt der Anteil von Fällen, die umklassifiziert wurden, minimal höher als bei den genannten Studien von Long und Bethune, wobei bedacht werden muss, dass unser Patientenkollektiv rein aus metastasierten Fällen bestand und außerdem auch andere Entitäten als Mammakarzinome, wenn auch in geringer Zahl, mit berücksichtigt wurden.

Außerdem haben wir unsere Daten entsprechend den Vorgaben der Arbeit von Ballard in der folgenden Tabelle modifiziert dargestellt (Tab. 30), um auch einen Eindruck über die Ursachen der Umklassifikationen zu erhalten.

Signalquotient LSI 17.2 / CEP 17	Quotient LSI 17.2-Signale / Tumorzellzahl		
	≤ 4	(> 4) bis (< 6)	≥ 6
< 2	46	19	11
≥ 2	2	6	22
unbestimmt	0		

Tab. 30: Darstellung der eigenen Ergebnisse analog zu der Darstellung nach Ballard et al. (2017); zu den Farben und Interpretationen siehe vorige Tab. 29 und den untenstehenden Text.

Innerhalb der seinerzeit 65 als negativ interpretierten Fälle wären 19 und damit ein recht großer Anteil (29,2% der Negativen, 17,9% aller 106 Fälle) gemäß den histologischen Kriterien als unklar zu klassifizieren gewesen. Elf Fälle wiesen offenbar eine Polysomie 17 auf - sie entsprechen dem Zuwachs an positiven

Fällen insgesamt. In zwei Fällen wäre eine Monosomie 17 zu vermuten - in der Tat lag jeweils der durchschnittliche CEP 17-Wert $< 2^7$. Unsere Datenverteilung ist bei vergleichsweise geringer Fallzahl sicherlich nicht uneingeschränkt mit der großen US-amerikanischen Studie vergleichbar, zeigt aber, dass auch in unserem Patientenkollektiv verschiedene genomische Effekte am Chromosom 17 zu beobachten waren.

Klinisch bedeuten die ASCO-Modifikationen, dass zumindest bezogen auf das Mammakarzinom mehr Patientinnen als geeignet für eine Trastuzumab-Therapie angesehen werden als früher - für das Magenkarzinom dürfte es sich ähnlich verhalten. Insgesamt wird somit mehr Patienten/-innen eine Therapie mit nicht unerheblichen Möglichkeiten, aber auch bedenkenswerten Risiken (s.o.) angeboten werden.

Darüber, inwieweit eine solche Therapie hilft und letztendlich aus klinischer und Patienten-bezogener Sicht sinnvoll ist, kann das Fach (Cyto-)Pathologie, in dem diese Arbeit entstanden ist, nicht urteilen - insbesondere nicht in metastasierter Situation. Die Überlebenskurven, die sich aus den klinischen Verläufen unserer Fälle erarbeiten ließen, zeigen jedenfalls, dass die HER-2/neu-positiven Patienten keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den HER-2/neu-negativen Patienten hatten - wobei allerdings die Medikation den Ergebnissen des früheren Auswertesystems gefolgt sein dürfte. Ob alle positiv getesteten Fälle noch eine Trastuzumab-gestützte Therapie erhalten haben, ließ sich nicht eruieren. Dass keine statistisch signifikanten Überlebensvorteile herausgearbeitet werden konnten, schließt sicherlich nicht aus, dass Patienten nicht dennoch von einer Trastuzumab-Medikation im metastasierten Stadium profitieren können, nur lässt sich ein solcher Vorteil eben nicht klar aus den zeitlichen Krankheitsverläufen ablesen. Dieses wäre nur in Form von Falldarstellungen möglich, in denen dann die möglicherweise verbesserte klinische Situation dokumentiert werden könnte - denn nicht (nur) die

⁷ Im einem beiden der Fälle waren 32 CEP 17-Signale in 20 Zellen erhoben worden (Durchschnittswert 1,6), im anderen 57 CEP 17-Signale in 40 Zellen (Durchschnittswert 1,4).

Überlebenszeit ist ein für die Patienten wichtiges Kriterium, sondern auch die therapeutisch beeinflussbare Lebensqualität.

Dass unsere Fälle, obwohl sie aus vielen verschiedenen Kliniken stammten und insofern als vielleicht nicht repräsentativ erscheinen könnten, dennoch eine gewisse Realität abbilden, zeigt sich in mehreren Überlebensdarstellungen, die anerkannte Erfahrungen aus der klinischen Medizin wiedergeben. Dieses gilt sowohl für die besseren Verläufe von Mammakarzinomen (im Vergleich zu Magenkarzinomen und anderen Tumorentitäten), als auch für die ebenfalls besseren Verläufe von Pleurakarzinomen (im Vergleich zu Perikard- und Peritonealkarzinomen) für Mammakarzinome und für alle in der Studie berücksichtigten Fälle.

Theoretisch wäre es allerdings durchaus möglich, die Hypothese, ob die ASCO-Modifikationen mit konsekutiver Trastuzumab-Therapie "neu-positiver" Fälle wirklich zu einer Verbesserung der Prognose führen. Dazu wäre eine *matched-pair*-Studie, beispielsweise aus einer Teilmenge der bei Ballard et al. (2017) dargestellten Fälle, denkbar, in der eine gewisse Zahl "neu-positiver" Fälle mit einer gleich großen Zahl "alt-positiver" Fälle mit ansonsten möglichst gleicher Alters-, Stadien- und Therapieverteilung verglichen würde. Auf diese Weise ließe sich zumindest retrospektiv eine Aussage treffen. Eine prospektive Studie, bei der man dann Patienten trotz "neu-positivem" HER-2/neu-Status eine adjuvante Trastuzumab-Therapie verweigern müsste, käme hingegen aus ethischen Gründen nicht in Betracht.

4.6 HER-2/neu-Diagnostik: Ausblick

Immunhistochemische Verfahren und FISH-basierte Verfahren haben den großen Vorteil für das morphologisch orientierte Fach Pathologie, dass sie biologische Effekte in visualisierter, mikroskopisch auswertbarer Form darstellen. Auf diese Weise können die Ergebnisse der Untersuchung fachärztlich darauf untersucht werden, ob sie technisch plausibel sind und auch die "richtigen Zellen" zur Auswertung gelangen. Letzteres ist beispielsweise wichtig in Fällen, bei denen neben invasiven Karzinomanteilen auch ein Carcinoma in situ vorliegt, das

anders als der Primärtumor reagieren kann und nicht in die Auswertung mit einbezogen werden darf.

Dennoch ist klar, dass die molekulopathologischen Verfahren, bei denen auf DNA- und / oder RNA-Basis Untersuchungen per PCR bzw. RT-PCR durchgeführt werden, in der Zukunft in immer größerem Maße auf die Diagnostik von malignen Tumoren und auch mancher anderer Erkrankungen Einfluss nehmen werden. Auch in der HER-2/neu-Diagnostik wird dieses vermutlich der Fall sein. Heute schon werden in bestimmten Fallkonstellationen von Mammakarzinomen Multigentests wie Endopredict, MammaPrint oder Oncotype angewandt, aus denen auf der Basis verschiedener Genexpressionen Rezidivrisiken über 5 oder 10 Jahre prognostiziert werden. Auch in der S3-Leitlinie für Mammakarzinome (S3 Mamma 2019) werden unter Nr. 4.31 Multigentests für Fälle ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) vorgesehen, wenn aufgrund der anderen prädiktiven Marker (ER, PR, HER-2/neu, Ki-67) *"keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie"* getroffen werden kann. Relativ enge Vorgaben dazu, welcher Test bei welcher Konstellation zu empfehlen ist, wurden seitens der ASCO gemacht (Harris et al. 2016, Krop et al. 2017). In einer europäischen Richtlinie wurden hingegen Vorschläge verschiedener renommierter Organisationen tabellarisch gegenübergestellt, wobei sich hier durchaus Unterschiede in den Empfehlungen zeigten (Duffy et al. 2017). Auch auf Abweichungen im Ergebnis für die HER-2/neu-Bestimmung zwischen den bisherigen Verfahren und den Multigentests wurde bereits in der Literatur hingewiesen; so wurden Fälle mit einem immunhistochemischen Score von 2+ und nachgeschaltetem FISH-Nachweis einer Genamplifikation dann im Oncotype-Multigentest als negativ bewertet (Tozbikian und Zynger 2018).

Unabhängig solcher bereits kommerzieller Multigentests wird auch die Entwicklung kleinerer Microarrays vorangetrieben, die mittels *next generation sequencing* (NGS) arbeiten und in diagnostischen Tests münden sollen. Hier sei als Beispiel auf eine Arbeit aus Heidelberg und München verwiesen (Pfarr et al. 2017), in der versucht wurde, Genexpressionsprofile für Fälle mit unklarem HER-2/neu-Ergebnis in der Immunhistochemie zu finden (Score 2+).

Sicherlich kann nicht zwangsläufig aus solchen Entwicklungen ein Ersatz der bisher gängigen Verfahren durch molekulare Untersuchungen folgen, jedenfalls nicht, solange noch größere Validierungsstudien mit Nachweis einer möglichst hohen Korrelation der Untersuchungsverfahren fehlen. Außerdem ergeben sich bislang noch die Indikationen zu molekularen Testungen aus den konventionellen Untersuchungsergebnissen. Es wäre aber durchaus denkbar, dass später die bisherigen prädiktiven Routinemarkers durch molekulare Routineanalysen ersetzt werden, sofern es einen Test geben sollte, der keine Voraussetzungen aus Voruntersuchungen mehr benötigt und gleichzeitig auch unter Kostengesichtspunkten akzeptabel ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Apple SK, Lowe AC, Rao PN, Shintaku IP, Moatamed NA: Comparison of fluorescent in situ hybridization HER-2/neu results on core needle biopsy and excisional biopsy in primary breast cancer. *Mod Pathol* 2009; 22: 1151-1159
2. Bahreini F, Soltanian AR, Mehdipour P: A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2015; 22: 615-625
3. Ballard M, Jalikis F, Krings G, Schmidt RA, Chen Y-Y, Rendi MH, Dintzis SM, Jensen KC, West RB, Sibley RK, Troxell ML, Allison KH: 'Non-classical' HER2 FISH results in breast cancer: a multi-institutional study. *Mod Pathol* 2017; 30: 227-235
4. Bang Y-J, van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK, ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
5. Beatty BG, Bryant R, Wang W, Ashikaga T, Gibson PC, Leiman G, Weaver DL: HER-2/neu detection in fine needle aspirates of breast cancer: Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 246-255
6. Beerli RR, Hynes NE: Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 1996; 271: 6071-6076
7. Bethune GC, Veldhuijzen van Zanten D, MacIntosh RF, Rayson D, Younis T, Thompson K, Barnes PJ: Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: a focus on tumours assessed as 'equivocal' for HER2 gene amplification by fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology* 2015; 67: 880-887
8. Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, Crafa P, Bassano C, Tamagnini I, Gardini G, Nizzoli R, Leonardi F, Gasparro D, Camisa R, Cavalli S, Silini EM, Ardizzoni A: Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Brit J Cancer* 2011; 104: 1372-1376
9. Chen M, Li Y, Ming Z, Biao A, Zheng LX: Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in gastric cancer. *Contemp Oncol* 2014; 18: 95-99

10. Christians A: Zusammenhang zwischen Chromosom 17 Polysomie, HER2-neu-Status und p53-Expression bei invasiven Mammakarzinomen. Med. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2007
11. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Sauer AG, Jemal A, Siegel RL: Breast cancer statistics 2019. CA Cancer J Clin 2019; 69: 438-451
12. DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.) (Hrsg.): Magenkarzinom-Leitlinie. Berlin, 2018, abgerufen am 16.01.2020, online unter:

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/index.html>
13. Dixon D: BMDP statistical software. Department of Biomathematics, University of California, Los Angeles, University of California Press, 1981
14. Dolan M, Snover D: Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2/neu status in routine practice. Am J Clin Pathol 2005; 123: 766–770
15. Dong Y, Ly A, Arpin R, Ahmed Q, Brachtel E: Breast fine needle aspiration continues to be relevant in a large academic medical center: experience from Massachusetts General Hospital. Breast Cancer Res Treat 2016; 158: 297-305
16. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F: Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). European Journal of Cancer 2017; 75: 284-298
17. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, Mass RD, Sanders C, Press MF: Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. Breast Cancer Res Treat 2005; 93:3-11
18. Fetsch PA, Abati A: The effects of antibody clone and pretreatment method on the results of HER2 immunostaining in cytologic samples of metastatic breast cancer: A query and a review of the riterature. Diagn. Cytopathol 2007; 35: 319-328
19. Forman D, Burley VJ: Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20: 633-649
20. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G: Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. Nature 1995; 378: 390-394

21. Geethamala K, Murthy VS, Vani BR, Rao MS, Thejaswini MU, Padmaja KP: Comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry on breast carcinoma: A boon or a bane? *J Lab Physicians* 2017; 9: 5-10
22. Goud KI, Dayakar S, Vijayalaxmi K, Babu SJ, Reddy PV: Evaluation of HER-2/neu status in breast cancer specimens using immunohistochemistry (IHC) & fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay. *Indian J Med Res* 2012; 135: 312-317
23. Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, Kussick SJ, Kandalaft PL, Kim PM, Tse CC: High concordance between immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization testing for HER-2 status in breast cancer requires a normalized immunohistochemical stain scoring system. *Mod Pathol* 2008; 21: 1271-1277
24. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; 16: 1647-1655
25. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, van Poznak C, Bast RC, Hayes DF: Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2016; 34: 1134-1150
26. He C, Bian XY, Ni XZ, Shen DP, Shen YY, Liu H, Shen ZY, Liu Q: Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2171-2178
27. Hynes NE; Stern DF: The biology of erbB-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1198: 165-184
28. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML: HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 2000; 5: 199-207
29. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481
30. King CR, Borrello I, Bellot, Comoglio P, Schlessinger J: EGF binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the erbB-2 protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3. *EMBO J* 1988; 7: 1647-1651
31. Koss GL (Hrsg.): Koss' diagnostic cytology and its histopathological basis. Verlag Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 5. Auflage, 2005
32. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, Hammond ME, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, van Poznak C, Wolff AC, Stearns V: Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women

- with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. J Clin Oncol 2017; 35: 2838-2847
33. Kuo SJ, Wang BB, Chang CS: Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment for HER-2/neu status in Taiwanese breast cancer patients. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007; 46, 146-151
 34. 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 2279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring. Am J Clin Pathol 2004; 121: 631-636
 35. Lan C, Liu JM, Liu TW: erb-b2 amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. Am J Clin Pathol 2005; 124: 97-102
 36. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C: Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. Nature 1995; 378: 394-398
 37. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2019a (Version 4.2, AWMF Registernummer: 032-045OL, abgerufen am 16.01.2020, online unter:
https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.2/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.2.pdf
 38. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Magenkarzinom, 2019b (Version 2.0, AWMF Registernummer: 032/009OL, abgerufen am 16.01.2020, online unter:
https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Magenkarzinom/Version_2/LL_Magenkarzinom_Langversion_2.0.pdf
 39. Long TH, Lawce H, Durum C, Moore SR, Olson SB, Gatter K, Troxell ML: The new equivocal: changes to HER2 FISH results when applying the 2013 ASCO/CAP guidelines. Am J Clin Pathol 2015; 144: 253-262
 40. Maurer S, Kolben T, Niemeyer B, Wolf C: Mammakarzinom-Prävention. In: Bauerfeind I (Hrsg.): Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 13-30

41. Mayr D, Beer M, Schmoeckel E: Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma. In: Bauerfeind I (Hrsg.): Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 65-97
42. Mayr D, Högel B: Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma. In: Bauerfeind I (Hrsg.): Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 14. Auflage, 2013, S. 57-85
43. Moriki T, Takahashi T, Ueta S, Mitani M, Ichien M: Hormone receptor status and HER2/neu overexpression determined by automated immunostainer on routinely fixed cytologic specimens from breast carcinoma: Correlation with histologic sections determinations and diagnostic pitfalls. Diagn Cytopathol 2004; 30: 251-256
44. Nishimura R, Kagawa A, Tamogami S, Kojima K, Satou M, Yamashita N, Teramoto N, Aogi K: Correlation of HER2 gene status assessment by fluorescence in situ hybridization between histological sections and cytological specimens of breast cancer. Breast Cancer 2016; 23: 211-215
45. Nizzoli R, Bozzetti C, Crafa P, Naldi N, Guazzi A, di Blasio B, Camisa R, Cascinu S: Immunocytochemical evaluation of HER2/neu on fine needle aspirates from primary breast carcinomas. Diagn Cytopathol 2003; 28: 142-146
46. Onko-Internetportal der Deutschen Krebsgesellschaft: Trastuzumab zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs, zuletzt aktualisiert am 22.11.2018, abgerufen am 16.01.2020, online unter:

<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/wirkstoff-glossar/trastuzumab.html>
47. Panjwani P, Epari S., Karpate A, Shirsat H, Rajsekharan P, Basak R, Shet T, Chinoy R, Chacko R, Gursale S, Baraskar N, Gupta S, Hawaldar R, Deasi S: Assessment of HER-2/neu status in breast cancer using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry: Experience of a tertiary cancer referral centre in India. Indian J Med Res 2010; 132: 287-294
48. Pantel K, Koprowski H, Riethmüller G: Conference on cancer micrometastasis: biology, methodology and clinical significance. Int J Oncol 1993; 3: 1019-1022
49. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng HJ, Seshadri R, Slamon DJ: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in

- situ hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol 2000; 18: 3651-3664
50. Pfarr N, Penzel R, Endris V, Lier C, Flechtenmacher C, Volckmar A-L, Kirchner M, Budczies J, Leichsenring J, Herpel E, Noske A, Weichert W, Schneeweiss A, Schirmacher P, Sinn H-P, Stenzinger A: Targeted next-generation sequencing enables reliable detection of HER2 (ERBB2) status in breast cancer and provides ancillary information of clinical relevance. Genes Chromos Cancer 2017; 56: 255-265
 51. Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, Rothwell VM, Buckley S: Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. Nature 1993; 366: 473-475
 52. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR: Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. Breast J 2005; 11: 433-439
 53. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM: HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. Mod Pathol 2000; 13: 866-873
 54. RKI 2017: Zur besseren Übersichtlichkeit im Text gewählte Kurzzitierweise für die Quelle "Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 2017", siehe unten
 55. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11. Ausgabe, Berlin, 2017
 56. Roche Pharma AG: Fachinformation Herceptin® i.v., Version 004044-41276, letzte aktualisierte Version Juli 2019, abgerufen am 16.01.2020, online unter:

<https://www.roche.de/pharma/arzneimittel.html>, File Fachinformation-Herceptin-600-mg-070219.pdf⁸
 57. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofman M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G: HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. Mod Pathol 2012; 25: 637-650
 58. S3 Magen 2019: Zur besseren Übersichtlichkeit im Text gewählte Kurzzitierweise für die Quelle "Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2019a", siehe oben

⁸ Das File Fachinformation-Herceptin-600-mg-070219.pdf muss durch Scrollen und Anklicken des Reiters "Herceptin 600 mg" in der Rubrik "Gebrauchsinformation" auf <https://www.roche.de/pharma/arzneimittel.html> geöffnet werden, es hat keine eigene Homepagekennung.

59. S3 Mamma 2019: Zur besseren Übersichtlichkeit im Text gewählte Kurzzitierweise für die Quelle "Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2019b", siehe oben
60. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232
61. Schrodi S, Engel J, Schubert-Fritschle G: Epidemiologie. In: Bauerfeind I (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 1-12*
62. Shabaik A, Lin G, Peterson M, Hasteh F, Tipps A, Datnow B, Weidner N: Reliability of Her2/neu, Estrogen Receptor, and Progesterone Receptor Testing by Immunohistochemistry on Cell Block of FNA and Serous Effusions From Patients With Primary and Metastatic Breast Carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2011; 39: 328-332
63. Shidham VB, Atkinson BF: *Cytopathologic diagnosis of serous fluids. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007*
64. Sibilio M, Wagner EF: Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; 269: 234-238
65. Silva A, Alarcão A, Ferreira T, d'Aguiar M, Ladeirinha A, Balseiro S, Carvalho L: Evaluation of HER2 by automated FISH and IHC in gastric carcinoma biopsies. *Int J Biol Markers* 2016; 31: e38-e43
66. Siveke JT, Angele MK, Engel J, Esposito I, Janetschek P, Lindner H, Novotny A, Schepp W, Schlesinger-Raab A, Schlitter M, Schulz C, Sandler A, Vogelsang H, Schuhmacher C: Magenkarzinom. In: Bruns CJ (Hrsg.): *Manual Gastrointestinale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 9. Auflage, 2013, S. 24-61*
67. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL: Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; 269: 14661-14665
68. Stadler P, Beer M, Lück A, Stoeckel E: Sonderfälle. In: Bauerfeind I (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 353-364*
69. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, La Mantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH,

- Coffey RJ, Magnuson T: Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269: 230-234
70. Tozbikian GH, Zynger DL: HER2 equivocal breast cancer that is positive by alternative probe HER2 FISH are classified as HER2 negative by Oncotype DX. *Breast J* 2018; 24: 535-554
 71. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M: Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma: interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001; 92: 2965-2974
 72. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G: Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001; 92: 2965-2974
 73. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM: Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2714-2721
 74. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC: Discrepancies clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2714-2721
 75. Tumorregister München (2018a): ICD-10 C16: Magenkarzinom. Inzidenz und Mortalität. Datum der Datenerstellung: 21.08.2018, Abrufdatum: 16.1.2020, online unter:

https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC16_G-ICD-10-C16-Magenkarzinom-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf
 76. Tumorregister München (2018b): ICD-10 C50: Mammakarzinom (Frauen). Inzidenz und Mortalität. Datum der Datenerstellung: 21.08.2018, Abrufdatum 16.01.2020, online unter

https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC50f_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf
 77. Varga Z, Noske A, Ramach C, Padberg B, Moch H: Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC Cancer* 2013; 13: 615
 78. Vohra P, Buelow B, Chen Y-Y, Serrano M, Singh Vohra M, Berry A, Ljung B-M: Estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer FNA cell blocks and paired histologic specimens: A large retrospective study. *Cancer Cytopathol* 2016; 124: 828-835

79. Wesola M, Jeleń M: A comparison of IHC and FISH cytogenetic methods in the evaluation of HER2 status in breast cancer. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24: 899-903
80. Williams SL, Birdsong GG, Cohen C, Siddiqui MT: Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor and HER2 expression in breast carcinomas: Comparison of cell block and tissue block preparations. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 476-480
81. Witton CJ: Structure of HER receptors and intracellular localisation of downstream effector elements gives insight into mechanism of tumour growth promotion. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 206-207
82. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison K, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3997-4013 [bzw. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 241-256 (Doppelveröffentlichung)]
83. Yan SY, Hu Y, Fan JG, Tao GQ, Lu YM, Cai X, Yu BH, Du YQ: Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1501-1506
84. Yan TL, Hu QD, Zhang Q, Li YM, Liang TB: National rates of *Helicobacter pylori* recurrence are significantly and inversely correlated with human development index. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 963-968
85. Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A: Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 65-71
86. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM: HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-1977