

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Intratumorale Heterogenität von *HER2* Amplifikationen in Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ivonne Kannengießer
geboren in Arnshausen

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am 26.10.2012

Veröffentlichung mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

Für meine Eltern
und für Bianca

Das Ganze ist viel mehr wert
als die Summe seiner Teile
- Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----------|
| 1. EINLEITUNG | 6 |
| 1.1. Das Bronchialkarzinom | 6 |
| 1.2. Epidemiologie | 6 |
| 1.3. Ätiologie/Risikofaktoren | 7 |
| 1.4. Trend | 9 |
| 1.5. Geographische Verteilung | 10 |
| 1.6. Klinik | 10 |
| 1.6.1. Symptome | 10 |
| 1.7. Histologische Klassifikation | 11 |
| 1.8. Diagnose/Staging | 12 |
| 1.8.1. Basisdiagnostik | 12 |
| 1.8.2. Bildgebende Verfahren | 13 |
| 1.8.3. Bronchoskopie | 13 |
| 1.8.4. Zytologische Diagnosestellung | 14 |
| 1.8.5. Thorakoskopie | 14 |
| 1.8.6. Mediastinoskopie/ Thoraxsonographie | 14 |
| 1.8.7. Nuklearmedizinische Diagnostik | 15 |
| 1.8.8. Stadieneinteilung | 15 |
| 1.9. Therapie | 19 |
| 1.9.1. Behandlungsstrategien | 19 |
| 1.9.2. Stadium I/II und IIIA (T3N1M0) | 19 |
| 1.9.3. Pancoast Tumor | 21 |
| 1.9.4. Stadium III (T1-3 N2/ T1-3 N3/ T4 N0-3) | 22 |
| 1.9.5. Stadium IIIA (N2) / IIIB (T4 N3) | 23 |
| 1.10. Molekulare Grundlagen | 23 |
| 1.10.1. Rezeptor-Thyrosinkinasen | 25 |
| 1.10.2. Funktion von HER2 | 26 |
| 1.10.3. HER2 spezifische Tumortherapien | 30 |
| 1.10.3.1 Trastuzumab | 31 |
| 1.10.3.2 Lapatinib | 32 |
| 1.10.3.1.1 Studienergebnisse | 33 |
| 1.11. Ziel der Arbeit | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 37 |
| 2.1. Patientenkollektiv | 37 |
| 2.2. TMA-Konstruktion | 37 |
| 2.2.1. Kontrollgewebe | 38 |
| 2.2.2 Array-Stanzgerät | 41 |
| 2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) | 41 |
| 2.4. Immunhistochemie (IHC) | 42 |
| 2.5. Auswertung der Großflächenschnitte/ Heterogenitätsanalyse | 43 |
| 2.6. Statistik | 43 |
| | |
| 3. ERGEBNISSE | 44 |
| 3.1. Klinische Daten | 44 |
| 3.2. Technische Aspekte | 47 |
| 3.3. <i>HER2</i> Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) | 51 |
| 3.4. <i>HER2</i> Immunhistochemie (IHC) | 53 |
| 3.5. <i>HER2</i> Amplifikation vs. <i>HER2</i> Überexpression | 54 |
| 3.6. Heterogenes Auftreten von <i>HER2</i> Amplifikation | 55 |
| | |
| 4. DISKUSSION | 58 |
| | |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 61 |
| | |
| 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 62 |
| | |
| 7. LITERATUR | 63 |
| | |
| 8. DANKSAGUNG | 73 |
| | |
| 9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | 74 |

1. EINLEITUNG

1.1. Das Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom weist eine hohe Mortalitätsrate auf, da die Erkrankung zunächst symptomarm verläuft und die Diagnosestellung zumeist in einem fortgeschrittenen Stadium erfolgt.

Trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Lungenkarzinom in europäischen und nordamerikanischen Ländern nur in einem Bereich von 5,5-15,7% (Alberg et al. 2007, National Institute for Clinical Excellence 2006).

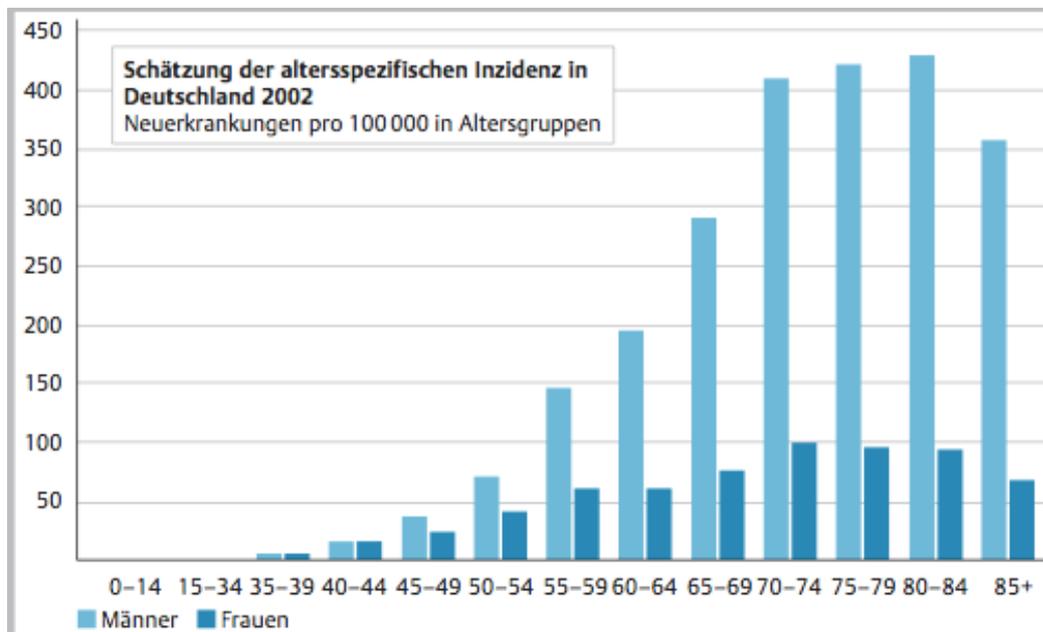
Obwohl die 5-Jahre-krankheitsfreie Überlebenszeit bei Patienten mit postoperativ detektiertem Stadium I bei über 80% liegt, verringert sich die erwartete Überlebenszeit in Stadium II und III dramatisch und ist im Stadium IV äußerst gering. Ohne Tumorresektion überleben nur wenige Patienten 5 Jahre, auch wenn bei ihnen zunächst ein Stadium 1A festgestellt wurde (Motohiro et al. 2002, Mc Garry et al. 2002).

1.2. Epidemiologie

Das Bronchialkarzinom ist mit jährlich über 40000 Sterbefällen in der Bundesrepublik Deutschland die vierthäufigste Todesursache und die häufigste Krebstodesursache (Statistisches Bundesamt 2007, Goeckenjan et al. 2010). 26% aller Krebstodesfälle bei Männern und 10% bei Frauen sind auf Lungenkrebs zurückzuführen. In Deutschland erkrankten 2002 etwa 45000 Menschen (32000 Männer und 13000 Frauen) an einem Bronchialkarzinom. Dies entspricht knapp 15% aller Krebsneuerkrankungen beim Mann und 6% bei der Frau. 2005 verstarben 40641 Patienten (28959 Männer und 11682 Frauen) an dieser Erkrankung (Statistisches Bundesamt 2009).

Die Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenzrate von Lungenkrebs nimmt mit dem Alter zu und erreicht ihr Maximum bei Männern und Frauen in der Altersklasse zwischen 80 und 84 Jahren (Deppermann 2011, Goeckenjan et al. 2010, Abbildung 1).

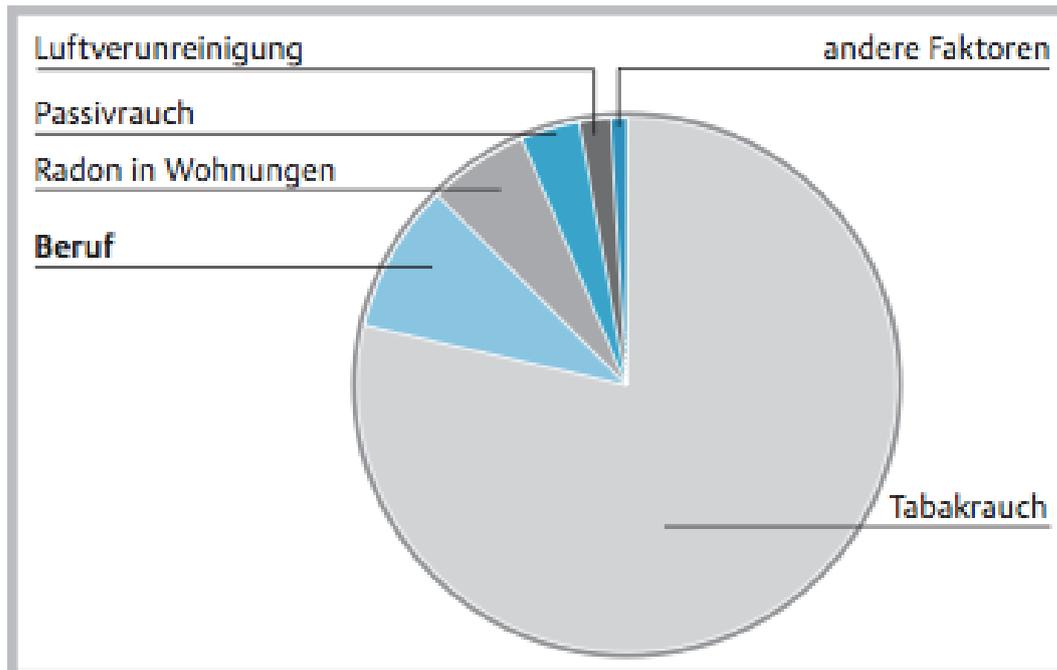
Abbildung 1: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenzrate für Lungenkrebs in Deutschland (GEKID 2006)



1.3. Ätiologie/Risikofaktoren

Als einer der größten Risikofaktoren ist der Zigarettenkonsum bekannt (Abbildung 2). Ätiologisch wird geschätzt, dass weltweit 90% der Bronchialkarzinome durch Zigarettenrauchinhalation verursacht werden (Doll et al. 2004, Peto et al. 2000). Dabei besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl gerauchter Zigaretten und dem Risiko ein Bronchialkarzinom zu entwickeln (Boffetta et al. 2011, Deppermann 2011).

Abbildung 2: Bedeutung einzelner Risikofaktoren im Hinblick auf das Lungenkrebsrisiko nach Pesch et al. 1995



Als weitere Risikofaktoren werden vor allem Passivrauchen und Ernährung sowie Exposition zu Radon, ionisierender Strahlung, partikulärer Luftverschmutzung, Dieselmotoremissionen und Asbest beschrieben. Weitere Risikofaktoren bestehen in der Exposition zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, künstlichen Mineralfasern, Chromaten, Nickel (metallisch und Nickelverbindungen), Di- und Monochlordimethylether, sowie Beryllium, Siliziumdioxid (kristallin), Cadmium, Arsen und wolfram- und kobalthaltigen Hartmetallstäuben und Viren (Epstein-Barr-Virus und humane Papillomaviren) (Goeckenjan et al. 2010).

Die berufliche Exposition wird für 9-15% aller Lungenkrebsfälle verantwortlich gemacht. Die Latenzzeit liegt bei 30-40 Jahren (Nowak und Huber 2006).

Generell sind zur Krebsentstehung mehrere Veränderungen erforderlich. Genetische Faktoren können zu einer beschleunigten Akkumulation von Mutationen und damit zu einem erhöhten Potential für die Krebsentwicklung in jungem Alter führen. Der erbliche Beitrag ist offenbar bei jungen Lungenkrebspatienten größer als bei älteren Patienten (Baley-Wilson et al. 2004, Kreuzer et al. 1998, Schwartz et al. 1996).

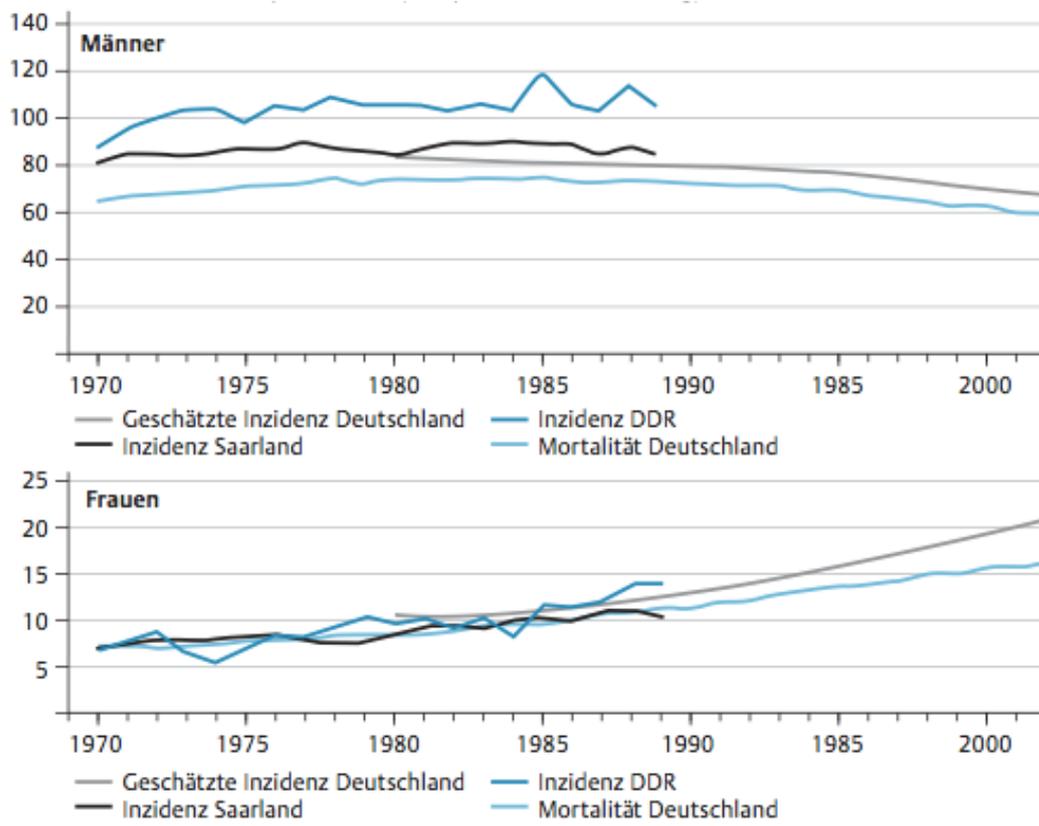
Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) bei Patienten, die niemals geraucht haben, ist charakterisiert von einer ansteigenden Inzidenz bei Frauen und einem häufigeren Auftreten von Adenokarzinomen im Vergleich zu Patienten

mit NSCLC bei Rauchern. Überdies gibt es bei Nichtrauchern eine bessere Prognose des NSCLC als bei Rauchern; dies gilt sowohl bei operierten als auch bei nicht operablen Karzinomen in fortgeschrittenem Stadium (Yano et al. 2011).

1.4. Trend

Die Erkrankungshäufigkeit erreichte bei Männern Ende der 1980er Jahre in Deutschland ihren Gipfel; seitdem ist die Inzidenz regredient. Bei Frauen nimmt demgegenüber die Erkrankungshäufigkeit zu (Abbildung 3). Erstmals traten bei Frauen unter 40 Jahren so viele Lungenkrebserkrankungen wie unter gleichaltrigen Männern auf. Dies ist im Wesentlichen auf den steigenden Anteil an Raucherinnen zurückzuführen (Goeckenjan et al. 2010, Robert-Koch-Institut 2008).

Abbildung 3: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970-2002
Fälle pro 100000 (Europastandardbevölkerung (Robert-Koch-Institut 2008))



1.5. Geographische Verteilung

Die geographische Verteilung des Bronchialkarzinoms zeigt große regionale Unterschiede. Bronchialkarzinome treten am häufigsten in entwickelten Ländern wie in Nordamerika und Europa auf. Sie sind dagegen selten in Entwicklungsländern, speziell in Südafrika und Südamerika zu finden. Während die Erkrankungshäufigkeit in den entwickelten Ländern abnimmt, nimmt sie in den Entwicklungsländern zu. Auch innerhalb der Länder schwankt die Lungenkrebshäufigkeit stark. Sie war in der Vergangenheit in großen Städten und in Industriegebieten besonders hoch. Dies führte zu der Annahme, dass die Luftverschmutzung hierfür verantwortlich sei. Die genauere Erforschung der Ursachen ergab, dass hierfür primär das regional stärkere Rauchen und die häufigere berufliche Exposition gegenüber Kanzerogenen verantwortlich waren. Die Luftverschmutzung leistete dagegen nur einen kleinen Beitrag. Dies gilt auch für Deutschland (Alberg und Samet 2005, Wichmann et al. 1991).

1.6. Klinik

1.6.1. *Symptome*

Circa 90% aller Patienten weisen bei Diagnosestellung Symptome auf. Neben Husten, Gewichtsverlust, Hämoptysen und Luftnot berichten die Patienten über Brust- und Knochenschmerzen sowie ein allgemeines Schwächegefühl. Die Prognose asymptomatischer Patienten ist geringfügig besser als diejenige symptomatischer Patienten (Carbone et al. 1970, Spiro et al. 2007). Mehrwöchige bis mehrmonatige Verzögerungen in der Diagnosestellung sind häufig. Sie entstehen einerseits durch die verspätete Vorstellung beim Hausarzt, andererseits durch die verspätete Vorstellung des Patienten bei einem Pneumologen (Koyi et al. 2002).

Die Diagnose eines Bronchialkarzinoms sollte innerhalb von 2 Monaten nach Auftreten klinischer Symptome gestellt und die Behandlung innerhalb von 6 Wochen nach Diagnosestellung eingeleitet worden sein (Spiro et al. 2007).

1.7. Histologische Klassifikation

Die histologische Klassifikation der Bronchialkarzinome erfolgt gemäß der WHO-Konsensuskonferenz von 2004 (Travis et al.):

Neben den kleinzelligen Karzinomen unterscheidet man folgende Typen nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome (Tabelle 1):

Tabelle 1: Histologische Klassifikation des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (WHO 2004)

| | |
|-----|--|
| I | <p>Plattenepithelkarzinom mit den Subtypen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Papilläres Plattenepithelkarzinom - Klarzelliges Plattenepithelkarzinom - Kleinzelliges Plattenepithelkarzinom - Basaloides Plattenepithelkarzinom |
| II | <p>Adenokarzinom mit den Subtypen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adenokarzinom mit gemischten Subtypen - Azinäres Adenokarzinom - Papilläres Adenokarzinom - Bronchioalveoläres Adenokarzinom <ul style="list-style-type: none"> → nicht muzinös → muzinös → gemischt muzinös und nicht-muzinös oder unbestimmt - Solides Adenokarzinom mit Schleimbildung <ul style="list-style-type: none"> → Fetales Adenokarzinom → Muzinöses Karzinom → Muzinöses Zystadenokarzinom → Siegelringzellkarzinom → Klarzelliges Adenokarzinom |
| III | <p>Großzelliges Karzinom mit den Subtypen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Großzelliges neuroendokrines Karzinom - Kombiniertes großzelliges neuroendokrines Karzinom - Basaloides Karzinom - Lymphoepitheliom-ähnliches Karzinom - Klarzelliges Karzinom - Großzelliges Karzinom mit rhabdoidem Phänotyp |

| | |
|-----|---|
| IV | Adenosquamöses Karzinom |
| V | Sarkomatoides Karzinom mit den Subtypen: <ul style="list-style-type: none"> - Pleomorphes Karzinom - Spindelzelliges Karzinom - Riesenzelliges Karzinom - Karzinosarkom - Pulmonales Blastom |
| VI | Karzinomide: <ul style="list-style-type: none"> - Atypisches Karzinoid - Typisches Karzinoid |
| VII | Karzinome vom Typ der Speicheldrüsenkarzinome mit den Subtypen <ul style="list-style-type: none"> - Mukoepidermoides Karzinom - Adenoid-zystisches Karzinom - Epithelial-myoepitheliales Karzinom |

1.8. Diagnose/Staging

1.8.1. *Basisdiagnostik*

Zur Basisdiagnostik eines Bronchialkarzinoms gehören eine gute Anamnese, die körperliche Untersuchung sowie eine nativradiologische Untersuchung des Thorax in zwei Ebenen und bei entsprechendem Verdacht auf ein Bronchialkarzinom eine Computertomographie, Bronchoskopie und eine Abdomensonographie (Goeckenjan et al. 2010).

1.8.2. Bildgebende Verfahren

Die Thoraxübersicht in zwei Ebenen wird als initiales radiologisches Verfahren in der Abklärung eines Bronchialkarzinoms empfohlen und ist das am häufigsten eingesetzte initiale radiologische Verfahren im Thoraxbereich.

Das Bronchialkarzinom zeigt sich hier direkt als Rundherd, oder indirekt als Atelektase, Mediastinalverbreiterung oder als Pleuraerguss. Sowohl bei positivem als auch bei negativem Befund und Diskrepanz zur Klinik sollte eine weitergehende Diagnostik erfolgen. Die Computertomographie sollte dabei grundsätzlich als kontrastmittelverstärkte Untersuchung von Thorax und Oberbauch durchgeführt werden. Die Diagnose eines Bronchialkarzinoms kann mittels Computertomographie auf vielfältige Weise gestellt werden: Offensichtliche Zeichen von Infiltrationen oder Metastasierung erlauben die Diagnose eines malignen Prozesses. Darüber hinaus ergeben sich aus morphologischen Kriterien, Kontrastmittelaufnahme oder Wachstumsnachweis in Verlaufsuntersuchungen klare Hinweise auf einen malignen Tumor. Da die Computertomographie genaue Informationen über die Lage von Läsionen liefert, sollte sie stets vor invasiven Maßnahmen wie einer Bronchoskopie erfolgen, um diese gezielt und zeitsparend durchführen zu können. In mehreren Studien galt die Kontrastmittelaufnahme als wichtiger Hinweis auf die Dignität eines solitären Rundherdes (Swensen et al. 2000).

1.8.3. Bronchoskopie

Die Bronchoskopie stellt die wichtigste Methode zur Diagnosesicherung dar. Insbesondere bei zentralen Tumoren besteht eine sehr gute diagnostische Sicherheit (Honeybourne et al. 2001). Bei peripheren Tumoren hängt die Trefferquote von der Rundherdgröße ab (Xie et al. 2002). Bei peripheren Tumoren sollte eine Kombination verschiedener Techniken zum Einsatz kommen wie der Einsatz von Bürste, Nadel, Katheter oder Zange (Yung 2003). Hierdurch kann unter Verwendung eines Durchleuchtungsgerätes die diagnostische Erfolgsquote gesteigert werden. Falls in vorausgegangenen Untersuchungen vergrößerte Lymphknoten gesehen wurden, sollte während der Bronchoskopie eine

transbronchiale Nadelaspiration erfolgen. Hier kann in bis zu 70% der Fälle eine zytologische Sicherung erreicht werden (Bungay et al. 2000).

1.8.4. *Zytologische Diagnosestellung*

Bei Patienten mit einem Bronchialkarzinom hat die Differenzierung zwischen einem kleinzelligen und einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom nach wie vor die größte Bedeutung, da sich deren Therapien grundsätzlich voneinander unterscheiden. Die Abgrenzung dieser beiden Entitäten kann durch Sputumzytologie, zytologische Beurteilung transthorakale Feinnadelaspirate sowie durch bronchoskopisch gewonnene Materialien wie Spülung, Bürstung bzw. Bronchiallavage und Biopsie erfolgen, falls eine histologische Sicherung nicht möglich ist (Goeckenjan et al. 2010).

1.8.5. *Thorakoskopie*

Bei Patienten mit unklarem Pleuraerguss und vor Durchführung einer kurativen Lokalthherapie (Operation, Bestrahlung) sollte bei unauffälliger Zytologie im Pleurapunktat eine Thorakoskopie entweder in Allgemeinnarkose oder in Lokalanästhesie zum Beweis bzw. zum Ausschluss einer pleuralen Metastasierung durchgeführt werden (Antunes et al. 2003). Im Falle eines kleinen peripheren Rundherdes sollte hingegen primär eine videoassistierte Thorakoskopie in Allgemeinnarkose durchgeführt werden (Goeckenjan et al. 2010).

1.8.6. *Mediastinoskopie/ Thoraxsonographie*

Bei Patienten mit vergrößerten Lymphknoten bietet die Mediastinoskopie die Möglichkeit einer invasiven histologischen Sicherung mit einer Sensitivität von 80-90% (Porte et al. 1998).

Die transthorakale Sonographie dient zum Erkennen eines Pleuraergusses und ist der Röntgenuntersuchung des Thorax diesbezüglich überlegen (Mayo und Doelken 2006, Beaulieu und Marik 2009).

1.8.7. Nuklearmedizinische Diagnostik

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives, nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren zur Darstellung und quantitativen Messung physiologischer Funktionen und biochemischer Prozesse mittels entsprechender Radiopharmaka. In der Onkologie nutzt die PET den erhöhten Tumorstoffwechsel und andere spezifische pathophysiologische Prinzipien zum Tumornachweis.

Die geringe Menge der für die Untersuchung verwendeten Radioisotope führt zu einer relativ geringen Strahlenexposition, die im Allgemeinen der Größenordnung einer Röntgen-Untersuchung entspricht. Aufgrund des stark vermehrten Glucosemetabolismus (gemessen als „Standardized Uptake Value“, SUV) der meisten soliden Tumoren sowie Lymphomen wird in der klinischen Praxis fast ausschließlich das Glucoseanalogon 2-F-18-Fluoro-2-Desoxy-D-Glucose (F-18-FDG) eingesetzt. PET-Vollringscanner stellen heute den Standard mit bestmöglicher Bildqualität dar. Eine technische Weiterentwicklung ist die integrierte PET/CT, womit die Vorteile der PET (hohe Sensitivität) und der CT (sehr gute morphologische Auflösung und anatomische Detaildarstellung) verknüpft werden (Goeckenjan et al. 2010).

1.8.8. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms erfolgte bis 2009 nach dem TNM System und der UICC-Stadieneinteilung in der 6. Auflage in der unverändert übernommenen 5. Fassung von 1997 (Sobin und Wittekind 2002). Ab 2010 gilt die 7. Auflage der TNM Klassifikation und Stadieneinteilung der UICC (Sobin et al. 2009, Detterbeck et al. 2009, Tabelle 2)

Tabelle 2: Vergleich der TNM-Klassifikation 5. und 6. Auflage mit der von der IASLC vorgeschlagenen Klassifikation (UICC 7. Auflage)

| UICC TNM 5.+6. Auflage | | IASLC, UICC TNM 7. Auflage | |
|------------------------|---|----------------------------|---|
| T1 | Tumor bis 3cm umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura Hauptbronchus bronchoskopisch frei | T1 | Tumor bis 3cm umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura Hauptbronchus bronchoskopisch frei |
| | | T1a | Läsion bis 2cm |
| | | T1b | Läsion > 2cm ≤3cm |
| T2 | Tumor >3cm oder Befall von Hauptbronchus ≥2cm entfernt von Carina oder viszerale Pleura infiltriert oder Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der ganzen Lunge | T2 | Tumor >3cm ≤7cm mit Befall von <ul style="list-style-type: none"> - Hauptbronchus ≥2cm entfernt von Carina oder - viszerale Pleura infiltriert oder - Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus aber nicht der ganzen Lunge |
| | | T2a | Läsion < 5cm |
| | | T2b | Läsion < 7cm |
| T3 | Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Brustwand oder - Zwerchfell oder - Mediastinaler Pleura oder - Parietalem Perikard | T3 | T2-Tumor >7cm Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Brustwand oder - Zwerchfell oder - Mediastinaler Pleura oder - Parietalem Perikard Hauptbronchus ≤2cm entfernt von Carina, Carina selbst frei Atelektase oder obstruktive Entzündung der ganzen Lunge getrennte Herde im gleichen Lungenlappen |
| T4 | Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Mediastinum oder - Herz oder - Großen Gefäßen - Trachea oder - Ösophagus oder - Wirbelkörper oder - Carina getrennte Herde im gleichen Lungenlappen Tumor mit malignem Pleuraerguss | T4 | Tumor jeder Größe mit Infiltration von <ul style="list-style-type: none"> - Mediastinum oder - Herz oder - Großen Gefäßen - Trachea oder - Ösophagus oder - Wirbelkörper oder - Carina Tumorherde im anderen Lungenlappen ipsilateral |

| | | | |
|----|--|-----|---|
| M1 | Tumorherde in einem anderen Lungenlappen ipsilateral | M1a | Tumor mit malignem Pleura- oder Perikarderguss Tumorherde in der kontralateralen Lunge |
| | Tumorherde in einem anderen Lungenlappen kontralateral Fernmetastasen | M1b | Fernmetastasen |

Eine Stadieneinteilung (Tabelle 3) sollte zur prognostischen Abschätzung, zur Therapieplanung und aus Gründen der Qualitätssicherung erfolgen. Lediglich bei den Patienten, die z.B. aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes einer tumorspezifischen Therapie nicht zugänglich sind und die somit nur supportiv-palliativ behandelt werden können, kann wegen fehlender therapeutischer Konsequenzen auf systematische Staginguntersuchungen verzichtet werden.

Tabelle 3: Neue Stadieneinteilung nach Vorschlag der IASLC (UICC 7. Auflage)

| | | | |
|-------------------|--------------------|----|----|
| Okkultes Karzinom | Tx | N0 | M0 |
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium IA | T1a | N0 | M0 |
| | T1b | N0 | M0 |
| Stadium IB | T2a | N0 | M0 |
| Stadium IIA | T1a | N1 | M0 |
| | T1b | N1 | M0 |
| | T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N1 | M0 |
| Stadium IIB | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| | T3 gleicher Lappen | N0 | M0 |

| | | | |
|--------------|-----------------------|---------|--|
| Stadium IIIA | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T3 gleicher Lappen* | N1 | M0 |
| | T3 gleicher Lappen* | N2 | M0 |
| | T4 Ausdehnung | N0 | M0 |
| | T4 Ausdehnung | N1 | M0 |
| | T4 Herde ipsilateral# | N0 | M0 |
| | T4 Herde ipsilateral# | N1 | M0 |
| Stadium IIIB | T4 Ausdehnung | N2 | M0 |
| | T4 Herd ipsilateral# | N2 | M0 |
| | Jedes T | N3 | M0 |
| Stadium IV | Jedes T | Jedes N | M1a (Maligner Pleura- oder Perikarderguss oder Kontralaterale Metastase) |
| | Jedes T | Jedes N | M1b (Fernmetastasen) |

* Herd/e im gleichen Lappen

Tumorherd/e im anderen Lungenlappen ipsilateral

1.9. Therapie

1.9.1. *Behandlungsstrategien*

Zur Behandlung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome stehen verschiedene stadienabhängige Therapieoptionen zur Verfügung. Dazu gehören chirurgische Eingriffe, Radio- und Chemotherapie. Außerdem stehen auch neuere Therapiekonzepte v. a. in der adjuvanten oder Rezidiv-Situation zur Verfügung; darunter solche mit Tyrosinkinaserzeptoren als Therapieziel.

1.9.2. *Stadium I/II und IIIA (T3N1M0)*

Die Operation in kurativer Absicht ist das Verfahren der Wahl. In Stadium I und II ist eine radikale Resektion anzustreben. Die Lobektomie einschließlich systematischer Dissektion ipsilateraler Lymphknoten ist die empfohlene chirurgische Maßnahme. In seltenen Fällen ist eine Pneumonektomie erforderlich. Bei bestimmter Tumorlokalisation ist eine Manschettenresektion zulässig, sofern ein ausreichender Sicherheitsabstand gewährleistet werden kann. Ist eine Lappenresektion aufgrund von Komorbiditäten oder einer Lungenfunktions-einschränkung nicht möglich, wird eine parenchymsparende Resektion oder eine Strahlentherapie empfohlen.

Auch bei Bronchialkarzinomen mit Brustwandinfiltration ist eine R0 Resektion anzustreben. Bei einer Pleurainvasion ohne Rippeninfiltration ist eine extrapleurale Lyse erlaubt und bei tieferer Infiltration eine Vollwandresektion obligat. Bei Brustwandinfiltration kann trotz histologisch dokumentierter R0 Resektion, aufgrund der Tumorlokalisation bzw. Nähe zum Resektionsrand eine postoperative Bestrahlung im Einzelfall erwogen werden. Bei R1 Resektion sollte wenn möglich die Nachresektion erfolgen. Ist eine Nachresektion nicht möglich wird die volldosierte Nachbestrahlung des OP-Bettes (60Gy in 6 Wochen) empfohlen. Die Entscheidung sollte interdisziplinär unter Beteiligung von Entscheidungsträgern mit hinreichender Erfahrung erfolgen (Gould et al 1999).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt heutzutage für das postoperativ gesicherte Stadium IA 69-89% (Mountain 1997), für das Stadium IB 52-75% (Okada et al. 2004). Das Stadium IIa, IIB (N1 Status) beschreibt den Befall intrapulmonaler und/oder hilärer Lymphknoten in Gegenwart eines T1- oder T2 Tumors. Die Operation in Form der Lobektomie, ergänzt durch ipsilaterale Lymphknotendissektion, ist Bestandteil der Behandlung in Stadium IIa und IIB (N1).

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für das Stadium IIA 45% (Mountain 1997) bis 52% (Okada et al. 2004), 33% für das Stadium IIB (N1) (Mountain 1997) und 24% (Mountain 1997) bis 44% (Okada et al. 2004) für das Stadium IIIA.

Nach R0 Resektion und systematischer Lymphknotendissektion sollten Patienten im Stadium II bzw. IIIA1/IIIA2 (Subklassifikation nach Robinson, Tabelle 4) in gutem Allgemeinzustand eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Der Beginn einer prä- und/oder postoperativen wie z.B. cisplatinbasierten Chemotherapie oder einer postoperativen Radiotherapie sind jedoch entsprechend Stadium und Allgemeinzustand des Patienten interdisziplinär zu diskutieren.

Die Strahlentherapie ist die effektivste Therapie des NSCLC im Stadium I/II bei „funktionell“ inoperablen Tumoren. Die Bezeichnung „funktionell“ umfasst sowohl Patienten, die aufgrund ihrer Lungenfunktionseinschränkungen wie auch aufgrund von bestehender Komorbidität oder Alter einem thoraxchirurgischen Eingriff nicht zugänglich sind. Bei inoperablen Patienten im Stadium T1-3N0 sollte die Indikation für eine adäquat dosierte, stereotaktische Strahlentherapie geprüft werden.

Tabelle 4: Klassifikation von Untergruppen des Stadiums (IIIA (N2) (nach Robinson et al. 2003 und 2007)

| Untergruppe | Beschreibung |
|-------------|---|
| III A1 | Inzidenteller Nachweis von mediastinalen Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation bei der postoperativen histologischen Untersuchung des Resektats |
| III A2 | Intraoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer Lymphknotenstation |

| | |
|--------|--|
| III A3 | Präoperativer Nachweis von Lymphknotenmetastasen in einer oder mehreren Lymphknotenstationen durch Staging mittels Mediastinoskopie, Feinnadelbiopsie oder PET |
| III A4 | „bulky“ (ausgedehnte) oder fixierte N2 Metastasen oder Metastasen in mehreren Lymphknotenstationen (mediastinale Lymphknoten >2-3cm) mit extrakapsulärer Infiltration; Befall mehrerer N2-Lymphknotenstationen; Gruppen multipler befallener kleinerer (1-2cm) Lymphknoten |

1.9.3. *Pancoast-Tumor*

Als Pancoast-Tumoren werden apikale Bronchialkarzinome (T3-T4) mit Pancoast-Syndrom (z.B. Infiltration von Plexus brachialis, Ganglion stellatum, Rippen, Wirbelkörper) bezeichnet, die im Lungenapex entstehen. Sie infiltrieren häufig die obere Thoraxwand mit Rippen und Wirbelkörpern. Ein Wachstum in den Plexus brachialis, das Ganglion stellatum und die subklavikulären Gefäße ist ebenfalls häufig. Je nach den infiltrierten Strukturen können Armschmerzen, Armparese, Hornersyndrom, oder Armvenenthrombosen das klinische Leitbild sein.

Pancoast-Tumoren stellen eine prognostisch eigenständige klinische Entität dar, die aber dennoch in sich eine große klinische Heterogenität aufweist. Die entscheidenden Faktoren dafür sind hierbei die unterschiedlichen Tumorstadien (IIB, IIIA, IIIB), wobei dem mediastinalen Lymphknotenbefall eine große prognostische Bedeutung zukommt. Aufgrund der Seltenheit dieses Krankheitsbildes gibt es bislang keine prospektiv-randomisierten klinischen Untersuchungen.

Trotz der ungünstigen Tumorlokalisation im Sulcus superior (Infiltration von Plexus cervicalis und/oder brachialis, Brustwand, Wirbelkörper, Rückenmark) ist die komplette Resektion des Tumors (R0: mikroskopisch freie Ränder) von entscheidender Bedeutung für die langfristige Prognose bei fehlendem

Lymphknotenbefall. Bei Pancoast-Tumoren im Stadium II-III B wird eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit anschließender Resektion empfohlen. Patienten mit technischer oder funktioneller Inoperabilität sollten eine definitive Radiochemotherapie erhalten (Goeckenjan et al. 2010).

1.9.4. Stadium III (T1-3 N2/ T1-3 N3/ T4 N0-3)

Die ursprünglich von Mountain beschriebene und von der UICC übernommene Stadienunterteilung in IIIA und IIIB unterscheidet technisch resektable jedoch prognostisch ungünstige Tumorausbreitungen in Stadium IIIA von der in der Regel technisch inoperablen Erkrankungsausdehnung (Stadium IIIB). Eine adjuvante Chemotherapie wird im Stadium IIIA mit inzidentiellem N2-Status (IIIA1 bzw. IIIA2) nach kompletter R0-Resektion und systematischer Lymphknotendisektion empfohlen.

Für den Einsatz der Operation im Stadium IIIA (N2) und bei selektionierten Patienten im Stadium IIIB ist die klare Abgrenzung von prognostischen Subgruppen gemäß des initial vorliegenden mediastinalen Lymphknotenbefalls von Bedeutung.

In Stadium IIIA1/IIIA2 und bei selektionierten Patienten in Stadium IIIB (T4 N0/1) und fehlenden Hinweisen auf einen mediastinalen Lymphknotenbefall (negatives CT, negative Mediastinoskopie, negatives PET) erfolgt primär die Operation. Wird dann intraoperativ makroskopisch oder mikroskopisch ein Befall mediastinaler Lymphknoten nachgewiesen (Stadium IIIA1 oder IIIA2 nach Robinson) erfolgt eine adjuvante Chemotherapie. Darüber hinaus sollte die Indikation für eine adjuvante mediastinale Radiotherapie im Nachgang zur Chemotherapie geprüft werden.

In der Subgruppe T4 N0/1 des Stadiums IIIA2 ist die primäre Operation bzw. die Integration operativer Therapieverfahren bei medizinischer und funktioneller Operabilität in folgenden Fällen möglich: Karinabefall, minimaler Trachealbefall, minimaler Befall des rechten Atrium, Infiltration der V.cava oder der Pulmonalarterie und ipsilobäre Metastase im tumortragenden Lungenlappen (Grunenwald und Le 1997, DiPerna und Wood 2005, Inoue et al. 1998, Nagai et al. 2007, Rami-Porta et al. 2007, Van Raemdonck et al. 1992).

Eine adjuvante Chemotherapie ist aufgrund des individuell hohen systemischen Rezidivrisikos möglich und interdisziplinär zu diskutieren.

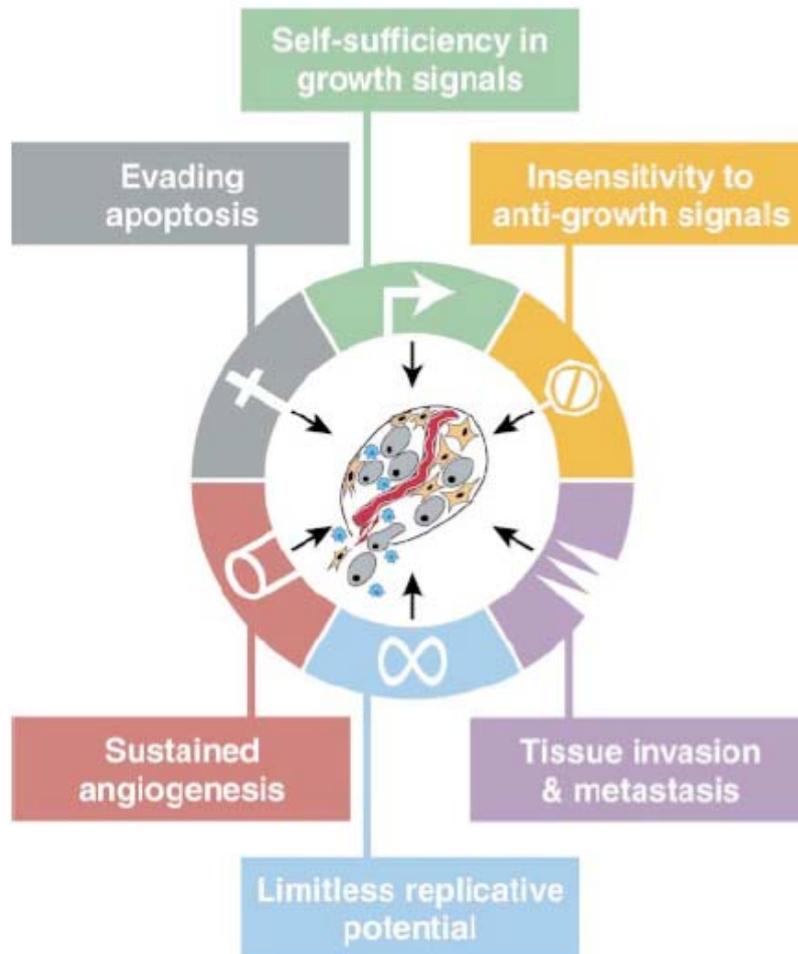
1.9.5. Stadium IIIA (N2) / IIIB (T4 N3)

Die Lebenszeit von Patienten im Stadium IIIB/IV ist begrenzt (Median 8-12 Monate). Bei Patienten im Stadium IIIB/IV in gutem Allgemeinzustand sollte eine cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie zur Verbesserung der Überlebenszeit, der Krankheitskontrolle und der Lebensqualität durchgeführt werden. Bei diagnostisch gesichertem Vorliegen einer singulären Metastase in Hirn oder Nebenniere und bei Vorliegen eines vollständig resezierbaren Lungentumors ohne Anhalt für mediastinale Lymphknotenmetastasen (cT1-4, cN0-1, cM1) kann im Einzelfall empfohlen werden, zunächst eine zerebrale Metastasektomie mit anschließender Ganzhirnbestrahlung oder eine Adrenalektomie vorzunehmen und anschließend den Lungentumor zu resezieren, sowie eine postoperative Chemotherapie vorzunehmen. Bei Patienten mit schmerzhaften Skelettmetastasen sollte die Indikation einer Strahlentherapie geprüft werden. In der Regel handelt es sich bei palliativen Lungenresektionen und Brustwandeingriffen um Einzelfallentscheidungen (Goeckenjan et al. 2010). Weitere Therapiemöglichkeiten gibt es z.B. in Form einer adjuvanten Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Eine Erst-Linien Therapie erfolgt bei aktivierender EGFR Mutation mit den EGFR Inhibitoren Gefitinib oder Erlotinib. Im folgenden Teil werden nun die pharmakologischen Grundlagen einer adjuvanten Antikörper-/Inhibitortherapie vorgestellt.

1.10. Molekulare Grundlagen

Hannahan und Weinberg (Hannahan und Weinberg 2000) haben in ihrem Artikel: "The Hallmarks of Cancer" die sechs Prinzipien geschildert, die für die Karzinogenese wichtig sind (Abbildung 4):

Abbildung 4: Die sechs Prinzipien der Karzinogenese nach Hannahan und Weinberg: „Selbstversorgung der Tumorzellen mit Wachstumssignalen, Nicht-Ansprechen auf Wachstumssignale, Fähigkeit der Apoptose zu entgehen, uneingeschränkte Teilungsfähigkeit, Fähigkeit zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung“



Für die Tumorentstehung ist die „Selbstversorgung“ der Tumorzellen mit Wachstumssignalen wichtig. Diese Signale werden in normalen Zellen durch Transmembranrezeptoren weitergeleitet, die verschiedene Liganden binden. Bei vielen Tumoren sind Wachstumsfaktorrezeptoren (oft mit Tyrosinkinaseaktivität) amplifiziert/mutiert. Dazu gehören z.B. der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) oder der HER2 Rezeptor. HER2 und EGFR sind homologe Rezeptoren, die zur erb-Tyrosinkinase-Rezeptorfamilie zusammengefasst werden. Genetische Aberrationen von *EGFR* oder *HER2* sind Indikatoren für ein aggressives Tumorwachstum und eine schlechte Prognose. Häufig sind sie amplifiziert bzw. überexprimiert.

HER2 Amplifikation findet sich häufig in Mammakarzinomen (Cho et al. 2008, Owens et al. 2004, Slamon et al. 1987). *EGFR* Amplifikationen lassen sich

dagegen häufig in Magenkarzinomen nachweisen (Marx et al. 2009, Yoshida et al. 1989).

Auch Mutationen von *EGFR* und *HER2* spielen bei der Entwicklung von Tumoren eine große Rolle (Paez et al. 2004, Wang et al. 2006).

1.10.1. Rezeptor-Tyrosinkinasen

Proteinkinasen sind Komponenten der Signalübertragungswege, welche das Zellwachstum und die Anpassung an die extrazelluläre Umgebung regulieren. Durch Weiterleitung von Informationen von extrazellulären oder zytoplasmatischen Vorgängen an den Nukleus werden die Gentranskription und/oder die DNA Synthese sowie cytoplasmatische Vorgänge beeinflusst.

Das humane Genom beinhaltet etwa 550 Proteinkinasen und dazu 130 Proteinphosphatasen, die die Phosphorylierung von Signalmolekülen regulieren. Die Proteinkinasen können in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden: Tyrosinkinasen, mit spezifischer Aktivität einzig für Tyrosinabbauprodukte, Serin-/Threoninkinasen mit einer Aktivität nur für Serin- und Threoninkinasen, sowie Kinasen, welche eine Aktivität für beide der zuvor genannten besitzen.

Tyrosinkinasen gehören somit zur Gruppe der Proteinkinasen. Man unterscheidet membrangebundene Tyrosinkinasen von nicht membrangebundenen Tyrosinkinasen. Durch Phosphorylierung wird die Aktivität des Zielproteins beeinflusst. Wachstumsfaktoren und andere Liganden binden und aktivieren die Tyrosinkinaserezeptoren unter physiologischen Bedingungen. Eine mutierte oder amplifizierte zellrezeptorgebundene Tyrosinkinase kann die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren simulieren und so auf die Zellproliferation einwirken (Chabner et al. 2011).

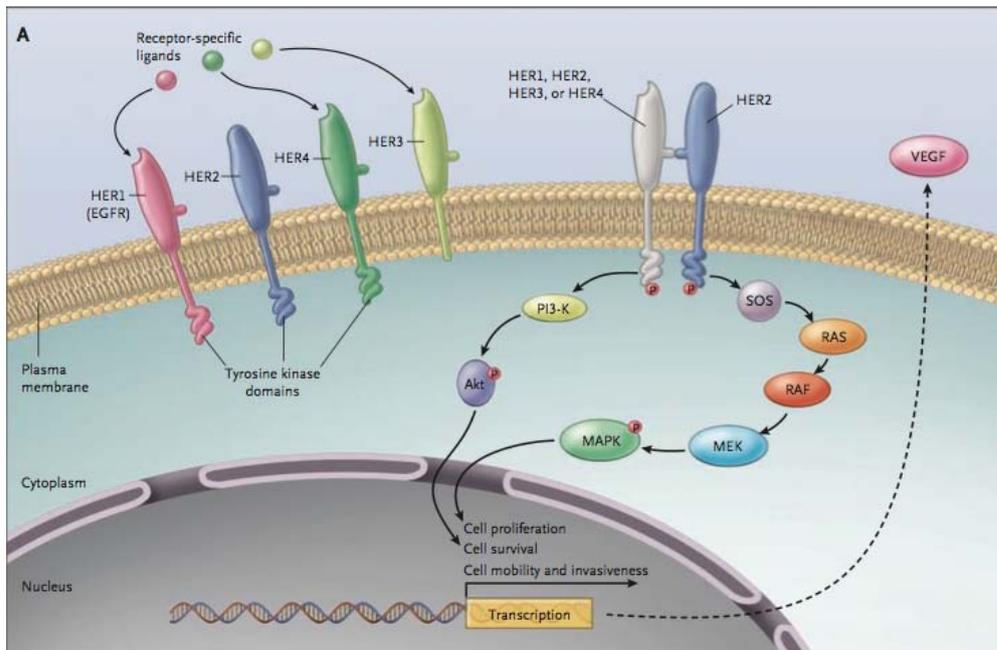
Eine abnormale Aktivierung spezifischer Tyrosinkinasen findet sich in vielen menschlichen Neoplasien, welche sie zu attraktiven molekularen Zielen für die Krebstherapie werden lassen (Blume-Jensen und Hunter 2001).

Zu einer Subgruppe von Thyrosinkinaserezeptoren zählen die Mitglieder der c-erb- bzw. human epidermal growth factor Moleküle wie HER1 (EGFR), HER2, HER3 und HER4 (Koutsoopoulos et al. 2007).

1.10.2. Die Funktion von HER2

HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. Es stimuliert die Zellproliferation über den RAS-MAP-Kinase-Weg und hemmt die Apoptose über den mTOR Signalweg (Yarden und Slivkowski 2001, Olayioye 2001, Hudis und Clifford 2007, Abbildung 5A).

Abbildung 5A: Signaltransduktion der HER-Familie (Hudis und Clifford 2007)



HER2 spielt eine große Rolle bei vielen menschlichen Krebserkrankungen und ist in gewissen Entitäten verbunden mit einer schlechten Prognose (Hynes und Lane 2005, Normanno et al. 2005, Rabindran 2005).

HER2 Amplifikation und *HER2* Überexpression sind z.B. wichtige Marker für schwere Krankheitsverläufe bei Patienten mit Mammakarzinomen.

HER2 Überexpression konnte auch in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen mittels Immunhistochemie in vielen Arbeiten in 4,4%-43% beobachtet werden (Tabelle 5). Dabei zeigte sich eine höhere Rate an Überexpression in Adenokarzinomen als in Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Bunn et al. 2001, Han et al. 2002, Heinmöller et al. 2003, Hirsch et al. 2002, Junker et al. 2005, Nakamura et al. 2003, Pelosi et al. 2005, Tan et al. 2003, Tabelle 5).

Tabelle 5: IHC entsprechend der FDA anerkannten Kriterien:

| Autor/ Jahr | Journal | Titel | Anzahl/ Positivität | Entität/ Korrelation | Kit |
|------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|
| Bunn et al. 2001 | Clinical cancer research | Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents | 6/19(2+3+)=31,6% 2+ (26%aller Zellreihen) 3+ (9%aller Zellreihen) | 3/10 AD 1/3 LCLC 2/6 PEC | HercepTest (DAKO, Corp., Carpinteria, CA) |
| Cappuzzo et al. 2005 | Journal of clinical oncology | Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients | 5/72=7,0% | Keine Angabe über Entitäten | Herceptest (DAKO, Glostrup, Denmark) |
| Cox et al. 2001 | International Journal of Cancer | Herceptest: Her2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer | 15/344=4,4% 8x2+, 7x3+ | Keine Angabe über Entität. Keine Korrelation zwischen HercepTest, Positivität, Differenzierung oder Histologie | HercepTest (DAKO, Glostrup, Denmark) |
| Erman et al. 2005 | Lung cancer | Epidermal growth factor receptor, HER-2/neu and related pathways in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features | 6/14=43% 2x2+, 4x3+ | Überexpression von HER2 war weniger häufig in muzinösen (17%) als in nicht muzinösen und gemischten Tumoren (63%) zu finden p=0,13 | HercepTest (DAKO, TAPPES, France) |
| Han et al. 2002 | Human pathology | Prognostic value of immunohistochemical Expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer | 25/85=29% Keine Angabe über Definition einer HER2-Überexpression | 18x AD 4x PEC 2x LCLC 1x AD-sq Keine signifikante Korrelation bezüglich Tumorgroße, Alter, Geschlecht, Histologie und Differenzierung | Rabbit polyklonal; DAKO, Capinteria, CA |
| Heinmöller et al. 2003 | Clinical cancer research | HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of Herceptin | 83/410=20% 76x2+, 7x3+ | 29% der AD 18% der PEC 11% der LCLC 17% der NSCLC (histologisch nicht näher gekennzeichnet) | HercepTest (DAKO, Hamburg) |
| Hirsch et al. | British Journal of cancer | Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas | 39/238=16% 30x2+, 9x3+ | 35% aller AD 20% aller LCLC 1% aller PEC | HercepTest (DAKO, Glostrup, Denmark) |
| Junker et al. 2005 | Clinical cancer research | HER2/neu expression and amplification in non-small cell lung cancer prior to and after neoadjuvant therapy | -Vor Chemotherapie: 8/105=7,6% 8x2+ -Nach Chemotherapie: 6/44=13,6% 5x2+, 1x3+ | Vor Chemotherapie: 5xAD 3xPEC Nach Chemotherapie: 4xAD 2xPEC | HercepTest |
| Langer et al. 2004 | Journal of clinical oncology | Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: Is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group Study 2598 | 44/139=31,7% 31x2+, 13x3+ | Keine Angabe über Entität | HercepTest (DAKO Corp., Carpinteria, CA) |

| | | | | | |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|---|
| Nakamura et al. 2003 | International journal of cancer. | Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer | 13/50=26% (2+,3+) | -10/34 (29%) aller AD -3/15 (20%) aller PEC 0/1 (0%) aller LCLC Überexpression eher in gut differenzierten AD Keine Korrelation zum Stadium | Rabbit antihuman HER2 protein polyclonal antibody (DAKO, Copenhagen, Denmark) |
| Pelosi et al. 2005 | International Journal of Cancer | Lack of prognostic implications of HER-2/neu abnormalities in 345 Stage I non-small cell carcinomas (NSCLC) and 207 Stage I-III neuroendocrine tumours (NET) of the lung | 29/345=8,4% 19x2+, 10x3+ | 9/173 AD (4x2+,5x3+) 19/159 PEC (14x2+,5x3+) 1/8 LCLC (2+) Keine Korrelation zwischen Überexpression und klinikopathologischen Eigenschaften | HercepTest |
| Saad et al. 2004 | Modern pathology | Prognostic significance of HER2/neu, p53, and vascular endothelial growth factor expression in early stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung | 19/50=38% (50xAD) 9/50= 18% (50xBAC) | In diesem Paper wurden nur AD und BAC untersucht. Bei Überexpression von HER2 in AD und BAC signifikant erhöhte Mortalitätsrate und signifikant verminderte Überlebenszeit | Rabbit polyclonal; DAKO, Carpinteria, CA, USA) |
| Tan et al. 2003 | Diagnostic molecular pathology | HER-2/neu protein expression and gene alteration in Stage I-III non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization | 25/131=19% 14/131=11% (2+) 11/131=8% (3+) | -HER2-Positivität vorwiegend bei AD 19/82 AD 4/44 PEC 2/5 LCLC (1x2+,1x3+) | HercepTest (DAKO Corp. Carpinteria, CA) |

Studienergebnisse bezüglich *HER2* Amplifikation wiesen eine ähnliche Schwankung wie bei der *HER2* Überexpression auf. In den genannten Studien wurden FDA anerkannte Reagenzien und Scoring Systeme genutzt. Trotzdem zeigten sich unterschiedliche Amplifikationsraten im Bereich von 1,2-43,2% (Tabelle 6).

Als Ursache für die deutlich voneinander abweichenden Amplifikationsraten sind unterschiedliche Patientenkollektive und unterschiedliche Positivitätsdefinitionen zu sehen.

Tabelle 6: FISH entsprechend der FDA anerkannten Kriterien:

| Autor/Jahr | Journal | Titel | Anzahl/ Ratio | Entität | Kit |
|------------------------|----------------------------------|---|---|---|--|
| Cappuzzo et al. 2005 | Journal of clinical oncology | Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients | 10/101 =9,9% 13/101 erhöhte Genkopieanzahl | 5/10 Amplifizierten waren AD 2/10 BAC 1/10 PEC 2/10 UnDIFFERENZIerte Karzinome | PathVysion HER-2 DNA probe KIT (Vysis/Abbott Laboratories, Downers Grove, IL) |
| Cox et al. 2001 | International Journal of Cancer | Herceptest: Her2 Expression and Gene amplification in non-small cell lung cancer | 4/344=1,2% ohne Angabe über Entität | Amplifikation in allen Tumoren mit hochgradiger HER2 Überexpression (3+) | Paraffin pretreatment reagent kit and the PathVysion DNA probe kit, jeweils Vysis, Downer's Grove, IL) |
| Heinmöller et al. 2003 | Clinical cancer research | HER2 status in non-small cell lung Cancer: results from patient screening for enrollment to a Phase II Study of Herceptin | 7/378=2% (5xRatio 2-4 2xRatio >4) | 5/143 AD 1/80 PEC 1/44 LCLC | PathVysion HER-2 DNA probe Kit (Vysis, Stuttgart) |
| Hirsch et al. 2002 | British journal of cancer | Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas | 2(4%) mit >16 Genkopien/Zelle 15(29%) mit 9-16 Genkopien/Zelle 26 (55%) mit 5-8 Genkopien/Zelle 8 (16%) mit <5 Genkopien/Zelle | Keine Korrelation zur Histologie | PathVysion HER-2 DNA probe KIT (Vysis/ Downers Grove, IL) |
| Hirsch et al. 2007 | Annals of oncology | Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib | 40/157=25% | 22x AD 9x BAC 6x PEC 3x unklassifizierte Karzinome | PathVysion HER-2 DNA probe KIT (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) |
| Junker et al. 2005 | Lung Cancer | HER2/neu expression and amplification in non-small cell lung cancer prior to and after neoadjuvant therapy | Vor Chemotherapie → 5/105=4,8% Nach Chemotherapie → 2/44=4,6% | 3xAD 2xPEC | FDA approved Inform Kit; Ventana Tucson, AZ, USA |
| Nakamura et al. 2003 | International journal of cancer. | Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer | 1/50=2% >3 Genkopien/Zelle in 22/50 NSCLC (44%) | > 3 Genkopien in -16/34 (47%) aller AD -6/15 (40%) aller PEC | Vysis (Downers Grove, IL) |

| | | | | | |
|--------------------|---|---|--|---|---|
| Pelosi et al. 2005 | International Journal of Cancer | Lack of prognostic implications of HER-2/neu abnormalities in 345 Stage I Nonsmall Cell carcinomas (NSCLC) and 207 Stage I-III neuroendocrine tumours (NET) of the lung | 7/94=7,4% | Hochgradige Amplifikation: 3xAD 1xPEC 1xLCNEC Geringgradige Amplifikation: 1xPEC 1xLCNEC Keine Korrelation zwischen Amplifikation und krankheitsfreiem Überleben | PathVysion HER-2 DNA probe Kit (Vysis, Stuttgart) |
| Pugh et al. 2007 | BMC Cancer | Correlations of EGFR mutations and increases in EGFR and HER2 copy number to gefitinib response in a retrospective analysis of lung cancer patients | 3/26 =11,5% (HER2/CEP17 ratio≥2) | Keine Angabe über Entität | PathVysion HER-2 DNA probe Kit (Vysis, Downers Grove, IL) |
| Soh et al. 2007 | International Journal of cancer | Impact of HER2 and EGFR gene status on gefitinib-treated patients with nonsmall-cell lung cancer | 32/74=43,2% | Keine Angabe über Entität | PathVysion HER-2 DNA probe Kit (Vysis, Downers Grove, IL) |
| Tan et al. 2003 | Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B | HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization | 7/131=5% mit Genamplifikation 10% mit mehr als 9 Genkopien pro Zelle 37% mit 5-9 Genkopien pro Zelle 48% 1-4 Genkopien pro Zelle 5% mit Gen/Chromosomratio >2 | Überlebenszeit schien bei Amplifikation erniedrigt zu sein p=0,05 5/7 aller amplifizierten Fälle waren IHC 3+ | PathVysion HER-2 DNA probe Kit (Vysis, Downers Grove, IL) |

1.10.3. HER2 spezifische Tumortherapien

Ein positiver HER2 Status ist Voraussetzung für eine HER2 spezifische Tumortherapie bei Mamma- und Magenkarzinomen.

Zur Beurteilung des HER2 Status sind von der US Food and Drug administration (FDA) zwei immunhistochemische Methoden (HercepTest; DAKO, Carpinteria, CA; Pathway; Ventana; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) und drei Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Methoden (PathVysion; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL; INFORM; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ; und PHarmDX; DAKO, Glostrup, Denmark) anerkannt (Sauter et al. 2009).

HER2 spezifische Tumorthérapien gibt es z.B. in Form von Trastuzumab und Lapatinib.

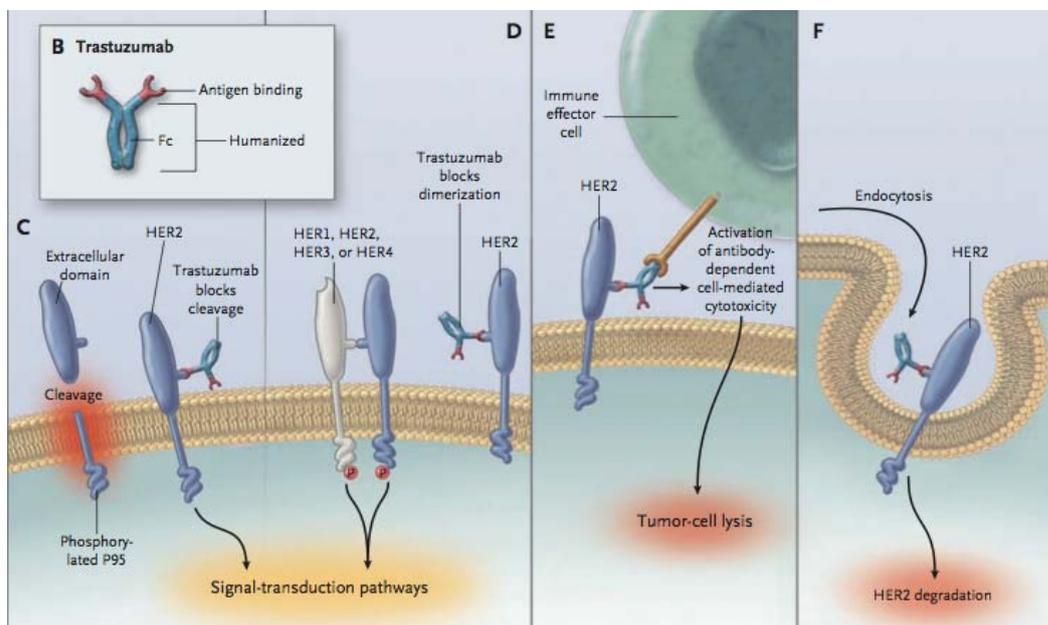
1.10.3.1. *Trastuzumab*

Bei Trastuzumab handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne des HER2 Rezeptors bindet. Dadurch wird die Dimerisierung geblockt, was wiederum zu einer Herabregulierung des Rezeptors an der Zelloberfläche durch Endozytose führt. Trastuzumab wirkt dabei indirekt über HER2 als Tyrosinkinaseinhibitor. Durch Herabregulation der HER2 Expression, werden die Aktivierung des Kinase-Rezeptors und die Aktivierung der Signalkaskade verhindert. Es kommt zur Aktivierung der Fcy vermittelten Antikörper-abhängigen-Zelltoxizität und zu einer Blockade angiogenetischer Effekte des HER2 Signalweges (Nahta und Esteva 2003, Abbildung 5B-F).

Trastuzumab zeigt gegenüber anderen zytotoxischen Agentien synergistische Effekte, welches aber nur bei HER2 überexprimierenden Tumoren beobachtet wurde (Baselga et al. 1998, Baselga 2000, Slamon et al. 2001).

Trastuzumab ist der erste monoklonale Antikörper der zur Behandlung solider Tumoren zugelassen wurde.

Abbildung 5B-F: Signaltransduktion der HER-Familie und Wirkungsmechanismen von Trastuzumab (Hudis und Clifford 2007)



Die Nebenwirkungen von Trastuzumab sind denen anderer monoklonaler Antikörper sehr ähnlich und beinhalten Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Dyspnoe, und Hautausschlag. Auch allergische Reaktionen wurden beobachtet.

Kardiotoxizität wird beschrieben. Die Ursache dafür ist noch nicht richtig verstanden. Letztlich wird das HER2 Antigen in der Herzentwicklung während der Embryogenese stark exprimiert. In einem Mäuseversuch entwickelten Mäuse eine Kardiomyopathie, bei denen eine auf die Ventrikel beschränkte Deletion des *HER2* Gens vorlag. Dies sind Hinweise darauf, dass HER2 gesteuerte Signalwege für den Herzmuskel zumindest von Bedeutung sind (Crone et al. 2002). Vor dem Beginn einer Trastuzumab-Therapie sollte daher eine kardiologische Abklärung erfolgen.

1.10.3.2. Lapatinib

Bei Lapatinib handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Inhibitor. Lapatinib und andere pan-HER2 Inhibitoren blockieren sowohl HER1 (EGFR) als auch HER2. Sie binden an die intrazelluläre Seite des Rezeptors im Gegensatz zu Trastuzumab, welcher an die extrazelluläre Seite des Rezeptors bindet. Ist die Kinase des Rezeptors blockiert, kann dieser nicht mit Hilfe von ATP phosphoryliert werden. Die Signalkaskade ist unterbrochen, die zu Proliferation und Tumorwachstum führt.

Es zeigt sich häufig ein therapeutischer Effekt bei Patienten bei denen es trotz einer Trastuzumab-Therapie zu einem Fortschreiten der Tumorerkrankung kam.

(Moy und Goss, 2007). Die unterschiedlichen Wirkungsweisen könnten für den Therapieerfolg von Lapatinib bei Trastuzumab-refraktären Patienten ursächlich sein.

Lapatinib ist FDA-anerkannt zur Therapie von HER2 positiven Trastuzumab-refraktären Mammakarzinomen in Kombination mit dem Fluoropyrimidin-Analogen Capecitabine. In einer Phase III Studie verbesserten Lapatinib und Capecitabine das krankheitsfreie Überleben um 4,4 Monate. Sie verbesserten auch die Ansprechrate auf 22% vs. 14% in der Kontrollgruppe in der nur mit Capecitabine allein therapiert wurde. Als sehr kleines Molekül kann es die Blut-Hirnschranke überschreiten. In einzelnen Fällen konnte ein Ansprechen bei Patienten mit

Hirnmetastasen und ein geringeres Auftreten von Hirnmetastasen in einer Phase III Studie beobachtet werden (Geyer et al. 2006).

Als Nebenwirkungen werden milde Diarrhoen, Cramping und verstärkter gastro-ösophagealer Reflux beschrieben. Bei Kombination von Lapatinib mit Capecitabine wurden starke Diarrhoen bei einem Drittel der Patienten beobachtet. Die EGFR-Hemmung durch Lapatinib verursachte einen akne-ähnlichen Hautausschlag bei einem Drittel der Patienten. Der Hautausschlag kann in den meisten Fällen durch Gabe von topisch oder oral verabreichten Antibiotika sowie durch die topische Gabe von Benzoylperoxid-Gel behandelt werden. Anders als Trastuzumab sieht man unter Lapatinib kein größeres Auftreten einer Kardiotoxizität (Medina und Goodin 2008). Trotzdem sollten Patienten mit Herzerkrankungen Lapatinib nur unter Vorsicht zusammen mit anderen cytotoxischen Medikamenten erhalten, da HER2 wie bei Trastuzumab das Zielagens darstellt.

1.10.3.1.1 Studienergebnisse

18-20% aller Mammakarzinome überexprimieren den HER2 Rezeptor aufgrund einer Genamplifikation auf Chromosom17 (Wolff et al. 2007). Amplifikation des HER2 Rezeptors ist mit einem geringeren Ansprechen auf Hormontherapien und einem geringeren Ansprechen auf cytotoxische Medikamente assoziiert (Slamon et al. 1989).

Patienten mit *HER2* amplifizierten Mammakarzinomen besitzen eine höhere Rezidivrate nach adjuvanter Therapie und eine geringere Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit Tumoren, die nicht *HER2* amplifiziert sind.

Trastuzumab und Lapatinib sind von der FDA zur Behandlung von HER2 positiven Mammakarzinomen anerkannt und klar assoziiert mit verbessertem klinischem Outcome bei metastasierten invasiv wachsenden HER2 positiven Mammakarzinomen. Sie sind dabei zur grundlegenden Therapie geworden. (Cobleigh et al. 1999, Geyer et al. 2006, Sauter et al. 2009, Slamon et al. 2001, Vogel et al. 2002). Trastuzumab ist auch FDA anerkannt zur Behandlung Lymphknoten-positiver (Picard-Gebhardt et al. 2005, Ramond et al. 2005, Sauter et

al. 2009) und Lymphknoten-negativer (Slamon et al. 2006, Sauter et al. 2009) HER2 positiver invasiv wachsender Mammakarzinome im Frühstadium.

Mittels Trastuzumab konnten auch gute Ergebnisse bei der Behandlung des Magenkarzinoms erzielt werden.

ToGA ist die erste randomisierte Phase III Studie zur Untersuchung bei Patienten mit inoperablem, lokal fortgeschrittenem, rezidivierendem und/oder metastasiertem HER2-positivem Magenkarzinom und Karzinomen aus dem gastrooesophagealen Übergangsbereich (n=584).

Es konnte gezeigt werden, dass die eingeschlossenen Patienten mit HER2 Überexpression einen signifikanten Überlebensvorteil durch Trastuzumab besitzen (13,8 vs. 11,1 Monate, $p < 0,0046$, Bang et al. 2010).

Eine derartige Therapiemöglichkeit wäre auch von besonderem Interesse zur Behandlung von Karzinomen mit schlechter Prognose wie z.B. der nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome.

Verschiedene klinische Versuche einer Therapie des Bronchialkarzinoms mit Trastuzumab schlugen fehl. In diesen Studien galten die immunhistochemischen Ergebnisse als Eingangskriterium (Tabelle 7). Dabei wurden auch Probanden mit weniger signifikanter HER2 Überexpression in diese Studien aufgenommen. Es scheint daher möglich, dass eine Behandlung von Probanden mit geringerer HER2 Expression zu den schlechten Ergebnissen in diesen Studien geführt hat (Bunn et al. 2001, Pellegrini et al. 2003).

Beim Mammakarzinom korreliert die *HER2* Amplifikation gut mit der immunhistochemisch nachweisbaren HER2 Überexpression (Ciampa et al. 2006, Dybdal et al. 2005, Jacobs et al. 1999, Owens et al. 2004, Pauletti et al. 2000, Perez et al. 2006, Press et al. 2005, Sauter et al. 2009, Yaziji et al. 2004). Experimentell wurde gezeigt, dass in Karzinomzellen ohne *HER2* Amplifikation ca. 25'000-185'000 HER2 Moleküle vorliegen. In *HER2* amplifizierten Tumorzellen sind jedoch 500'000-2'000'000 HER2 Moleküle nachweisbar (Konecny et al. 2003).

Aus verschiedenen Gründen zeigt die Bestimmung des HER2 Status mittels FISH eine höhere Sensitivität und Spezifität als die immunhistologische Untersuchung. Insbesondere die fehlende interne Kontrolle und die Abhängigkeit der Immunhistochemie von der Gewebefixierung sind dafür verantwortlich (Sauter et al. 2009).

FISH dagegen ist relativ unabhängig von Gewebefixationsmethoden (Sauter et al. 2009).

Tabelle 7: Klinische Versuche mit Trastuzumab bei Patienten mit NSCLC

| Autor/ Jahr | Journal | Titel | Einschlusskriterium | Anzahl | Therapie | Resultate | Hypothese |
|------------------------|------------------------------|---|--|--------|---|---|--|
| Clamon et al. 2005 | Cancer | Lack of trastuzumab activity in nonsmall cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2: 39810: a phase II trial of Cancer and Leukemia Group B | IHC 2+ oder 3+ | 24 | Nur Trastuzumab | -1 Patient bei Z.n. Chemotherapie mit teilweise Ansprechen -6 Patienten mit Verminderung der zuvor detektierten Läsionen -1 Patient mit stable disease -Gründe für Therapieabbruch: Fortschreitende Erkrankung bei 14 Pat. und Toxizität | -Trastuzumab nicht als Standardtherapie einsetzbar -Patienten mit IHC 3+ könnten einen Behandlungsvorteil besitzen (Nur ein Patient mit IHC 3* in dieser Studie) |
| Gatzemeier et al. 2004 | Annals of Oncology | Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer | -IHC 2+ oder 3+ - FISH HER2/ Chromosom 17Ratio ≥ 2 -ELISA HER2 Konzentrationen >15ng/ml | 103 | n=50 Therapie mit Gemcitabine und Cisplatin n=51 Therapie mit Trastuzumab, Gemcitabine, und Cisplatin n=2 erhielten keine Therapie | Ansprechrate in beiden Therapiearmen in etwa gleich (36 vs. 41%) -Höhere Ansprechraten und längere Überlebenszeit bei IHC 3+ und FISH positiven Patienten in beiden Therapiearmen | -Kein klinischer Vorteil für die Trastuzumab-Gruppe -IHC 3+ und FISH positive Patienten könnten von einer Trastuzumab-Therapie profitieren. Diese Untergruppe war in dieser Studie zu klein |
| Langer et al. 2004 | Journal of Clinical Oncology | Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? | IHC 1+, 2+ oder 3+ | 53 | Trastuzumab, Paclitaxel und Carboplatin | Ansprechrate von 24,5% (7/21 1+, 4/23 2+, 2/8 3+) | -Zukünftige Studien sollten Patienten mit FISH positiven oder IHC 3+ Tumoren untersuchen -Screening bei nur geringer Anzahl von Patienten sehr erschwert |
| Zinner et al. 2004 | Lung Cancer | Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease | -Stadium IIIb, Stadium IV -IHC 1+, 2+ oder 3+ - ELISA HER2 Konzentrationen >15ng/ml | 21 | Trastuzumab, Cisplatin und Gemcitabine | Teilweise Ansprechen bei 8 Patienten (38%) im 1. Jahr Überlebensrate bei 62% | Pat. mit positivem ELISA, IHC 3+ und FISH positive Patienten könnten eine Behandlungsvorteil besitzen Diese Gruppe in dieser Studie war zu klein |

Intratumorale Heterogenität von Überexpression und Amplifikation sind ein anderer möglicher Grund für das Nicht-Ansprechen HER2 positiver Karzinome. Heterogene *HER2* Amplifikation ist selten in Mamma- und Magenkarzinomen (Andersson et al. 2004, Marx et al. 2009), tritt aber häufig (>50%) in Blasenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen auf (Marx et al. 2010, Sauter et al. 1993).

1.11. Ziel der Arbeit

Diese Studie hat das Ziel, die Rate an HER2 Überexpression und *HER2* Amplifikation in Bronchialkarzinomen zu überprüfen und das Ausmaß der HER2 Heterogenität zu ermitteln.

In Analogie zu Beobachtungen in der Therapie des Mammakarzinoms soll dabei die mittels FISH-Analyse ermittelte Genamplifikationsrate bzw. das Ausmaß der Heterogenität Hinweise geben auf einen Therapieerfolg/Therapieversagen von Trastuzumab. Möglicherweise lässt sich so aus der Population der Bronchialkarzinom-Patienten eine Subpopulation identifizieren, die von einer gezielten Trastuzumab-Therapie profitieren könnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientenkollektiv

Die Studie schließt Patienten ein, die zwischen 1992 und 2006 aufgrund eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert wurden. Davon wurden 590 Patienten in diese Studie eingeschlossen. Von den 590 Patienten hatten 219 ein Adenokarzinom (AD), 250 ein Plattenepithelkarzinom (PEC) und 121 ein großzelliges Karzinom (LCLC). Alle Patienten wurden mit kurativer Intention operiert. Kontinuierliche Follow-up-Daten wurden von 290 Patienten erhoben. Die Überlebensdaten wurden von der Abteilung für Thorax- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Eppendorf zur Verfügung gestellt. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 29 Monate (1-155 Monate). Bei den Gewebeproben handelte es sich um formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material, welches in den Jahren 1992-2006 am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eingegangen war. Aus den jeweiligen schriftlichen pathologischen Befunden wurden für diese Arbeit die Informationen bezüglich der Ausdehnung des Primärtumors (pT), des Lymphknotenstatus (pN) und des Differenzierungsgrades (G) der einzelnen Tumoren entnommen. Die Gewebeschnitte jeder Probe wurden von einer Fachärztin für Pathologie des Institutes (Dr. Susan Koops) für diese Studie nachbefundet. Die klinikopathologischen Eigenschaften der Patienten sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

2.2. TMA- Konstruktion

Die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des jeweiligen Primärtumors wurden nach Anfertigung eines HE-Schnitts, mit Kennzeichnung der Tumorregion durch einen Facharzt für Pathologie, zur TMA-Erstellung verwendet (Kononen et al. 1998). Gewebszylinder mit einem Durchmesser von 0,6mm

wurden innerhalb dieser Tumorbezirke mit der Hilfe eines selbstgebauten halb-automatischen „Tissue-arrayer“ (Abbildung 8) herausgestanzt.

Der gesamte TMA besteht aus 2 Empfängerblöcken mit insgesamt 590 Gewebeprobe. Ein HE gefärbter Schnitt ist in Abbildung 6 dargestellt. Jeweils ein einzelner mit Hematoxylin-Eosin angefärbter Spot eines Plattenepithel-, Adeno-, und eines Großzelligen Karzinoms ist in Abbildung 7A-C dargestellt. Die 3µm-dicken Schnitte wurden mit der Hilfe vom Paraffin Sectioning Aid System (Instrumentics, Hackensack, NJ) hergestellt. Aufeinanderfolgende Schnittstufen wurden zur Herstellung eines HE-gefärbten Referenzschnittes, zur Untersuchung durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie genutzt.

2.2.1. Kontrollgewebe

Als Kontrollgewebe verwendeten wir: Lunge (n=2), Haut (n=2), Skelett- (n=2) und Herzmuskulatur (n=2), Endometrium (n=2), Kolonmukosa (n=2), Lymphknoten (n=2), Prostata (n=2) Nieren (n=2), Mammakarzinome (n=10), Bronchialkarzinome (Plattenepithel- n=5 und Adenokarzinome n=5), Kolonkarzinome (n=10) und Prostatakarzinome (n=10).

Abbildung 6: Übersichtsaufnahme vom Lungen TMA (HE-Färbung)



<----->
7mm

Übersichtsaufnahme des Lungen TMA (HE-Färbung). Jeder Spot entspricht einem Gewebekblock eines anderen Patienten. Durch die Anordnung in Blöcken (in absteigender Größe: A+B, C+D, E+F) und Reihen kann die Zugehörigkeit wiedergegeben werden.

Abbildung 7A-C: Beispiele für ein Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und ein Großzelliges Karzinom der Lunge vom Lungen-TMA (Durchmesser jeweils 0,6mm)

Abbildung 7A: Beispiel eines Adenokarzinoms
(HE-Färbung)

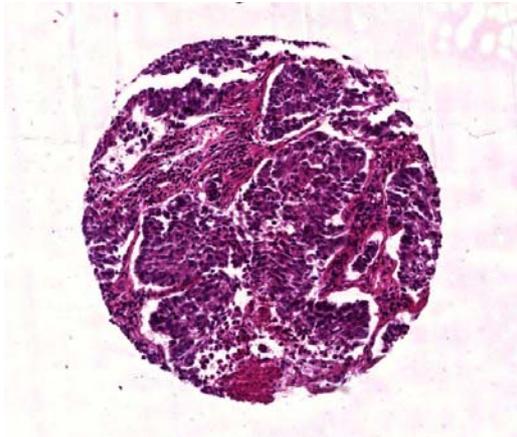


Abbildung 7B: Beispiel eines Plattenepithelkarzinoms
(HE-Färbung)

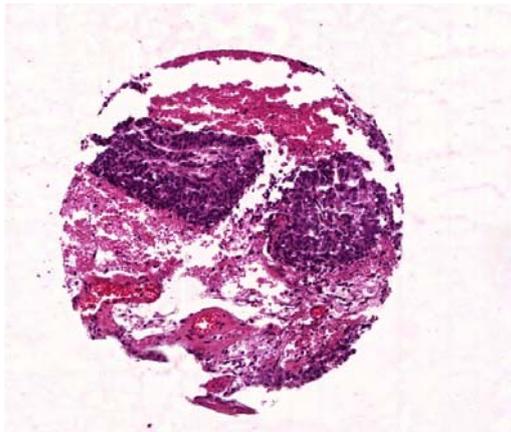
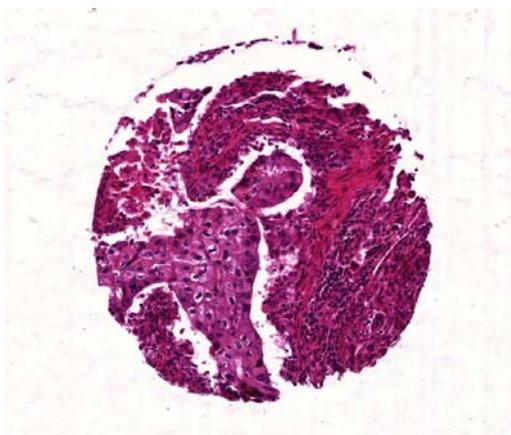


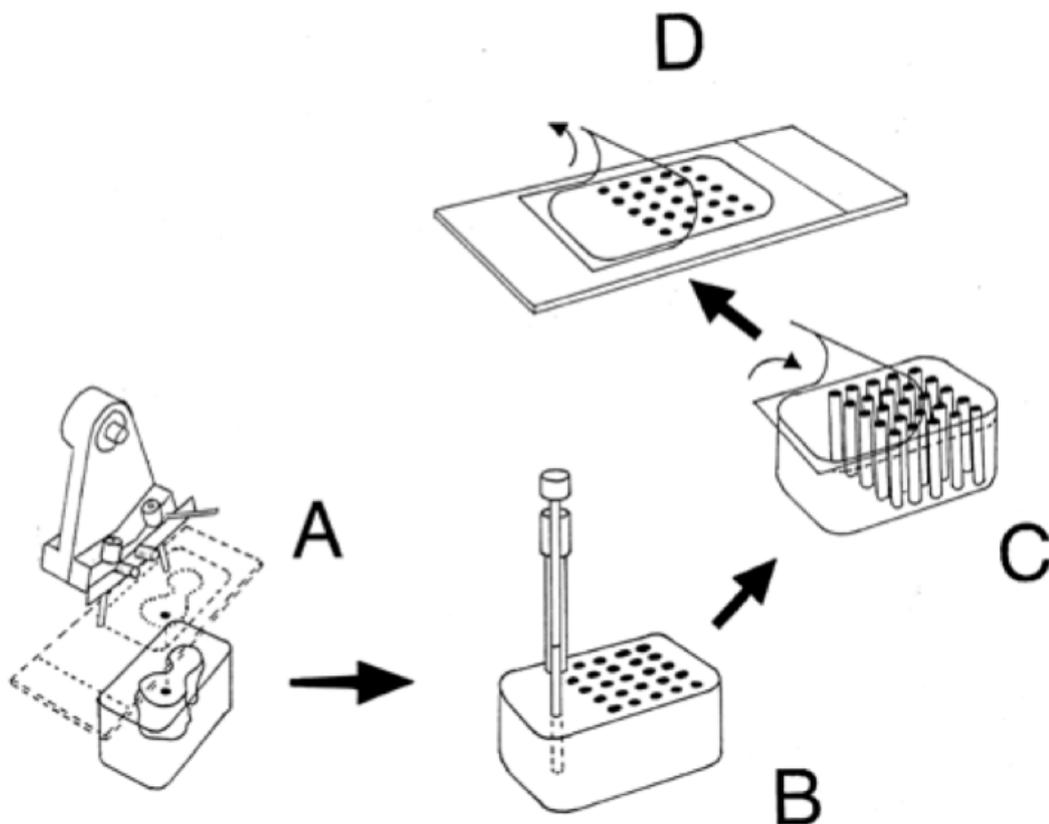
Abbildung 7C: Beispiel eines Großzelligen Karzinoms
(HE-Färbung)



2.2.2. Array-Stanzgerät

Das Array-Stanzgerät (Abbildung 8) besteht aus zwei Hohladeln. Eine dünnere Nadel macht es möglich, Löcher in die Empfängerblöcke zu stanzen. Die dickere Nadel dient der Entnahme von Tumorgewebsstücken aus den Spenderblöcken und deren Einbringen in den Empfängerblock.

Abbildung 8: Array-Herstellung (Bubendorf et al. 2001)



2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zur proteolytischen Vorbehandlung der Gewebeproben wurde ein handelsüblicher Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet (Paraffin pre-treatment reagent kit, Abbott Laboratories, Abbott Park, USA). Die *HER2*-Sonde (Spektralorange) wurde zusammen mit der Centromer17 Sonde (spektralgrün; Path Vysion TM, Vysis Abbott) benutzt.

Vor der Hybridisierung wurden die Schnitte entparaffinisiert, luftgetrocknet, dehydriert und anschließend für 5 Minuten bei 74°C in 70% Formamid-2-X-SSC Lösung denaturiert. Nach Hybridisierung über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer wurden die Objektträger gewaschen und mit 0,2 µm DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) in einem Bleichbad gegengefärbt. Unser Kriterium für *HER2* Amplifikation waren eine *HER2* zu Centromer17-Signallratio von ≥ 2 und das Vorliegen von ≥ 4 Gensignalen. Eine niedriggradige (low-level) Amplifikation wurde definiert als eine *HER2* zu Centromer17-Signallratio von > 2 und einer Anzahl von < 10 Gensignalen. Dementsprechend wurde eine hochgradige (high-level) Amplifikation durch eine Ratio von > 2 und eine Anzahl von ≥ 10 Gensignalen definiert. Alle anderen Karzinome wurden als nicht amplifiziert klassifiziert.

2.4. Immunhistochemie

Der HercepTest TM (DAKO, Glostrup, Dänemark) zur Quantifizierung der *HER2* Proteinexpression wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Antigendemaskierung an den entparaffinisierten Gewebeproben erfolgte für 50 Minuten in einem Wasserbad bei 95°C bis 99°C, gefolgt von einer Peroxidasehemmung mit anschließender Inkubation mit dem verdünnten Antikörper. Vom Hersteller bereitgestellte Objektträger mit Zellinientests wurden zur Positiv-, Negativkontrolle und cut-of control genutzt. Die immunhistochemische Färbung wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers von einem Pathologen ausgewertet.

Die Tumorproben wurden im Rahmen einer 4 Stufen-Scala klassifiziert (0, 1+, 2+, 3+) entsprechend der HercepTest Anleitung.

2.5. Auswertung der Großflächenschnitte/ Heterogenitätsanalyse

Um die FISH-Ergebnisse vom Tumorarray zu bestätigen und um das Ausmaß der Heterogenität der Amplifikation zu ermitteln, wurden von den 10 hochgradigen (high-level) *HER2* amplifizierten Fällen alle vorhandenen Paraffinblöcke an Großflächenschnitten mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung analysiert (Tabelle 9). Die gesamten Tumorareale wurden bezüglich Homo- bzw. Heterogenität untersucht. In Fällen einer heterogenen Verteilung der Genamplifikation im Tumor erfolgte eine zusätzliche immunhistologische Reaktion gegen *HER2* am Großflächenschnitt.

2.6. Statistik

Die Kontingenz-Tabellen-Analyse und der Chi-square (Likelihood) Test wurden genutzt, um die histopathologischen Parameter des Bronchialkarzinoms zu untersuchen.

Überlebenskurven wurden nach der Methode von Kaplan-Meier gezeichnet. Die statistische Relevanz molekularer Parameter auf das Patientenüberleben wurde mit dem Log-Rank Test überprüft. Dabei galt die krankheitsbedingte Überlebenszeit als Endpunkt. Die genannten Auswertungen erfolgten mit Hilfe des SPSS statistical software package for windows (Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

Für die statistische Analyse wurde die JMP 8.0 software (SAS Institute Inc., NC, USA) genutzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Klinische Daten

Die klassischen, im TNM-System erfassten Parameter TumorgroÙe pT ($p < 0,0001$; Abbildung 9A), Lymphknotenstatus pN ($p < 0,0001$; Abbildung 9B), Fernmetastasen pM ($p < 0,0001$; Abbildung 9C) und UICC Stadium ($p < 0,0001$; Abbildung 9D) waren im Gegensatz zu Differenzierung ($p = 0,7146$; Abbildung 9E) und histologischem Subtyp ($p = 0,5897$; Abbildung 9F) signifikant assoziiert mit der Überlebenszeit.

Abbildung 9A:

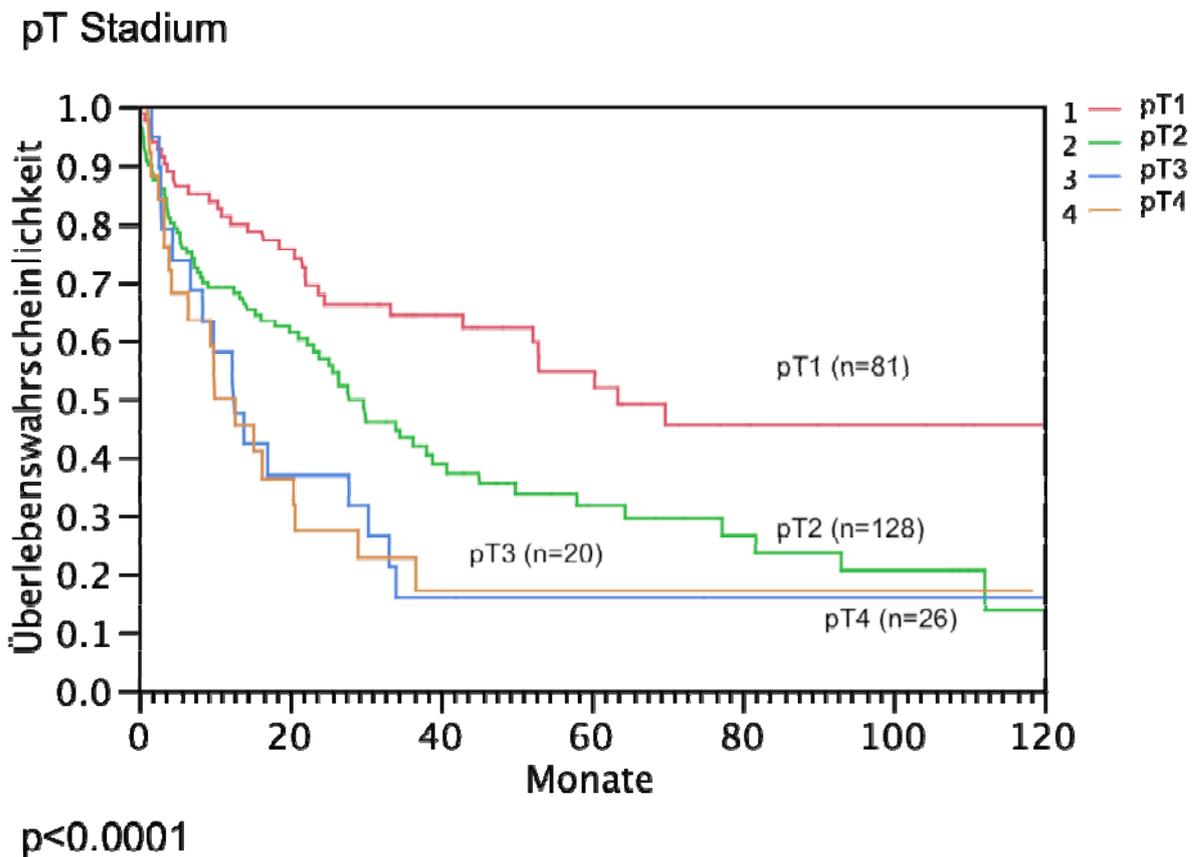
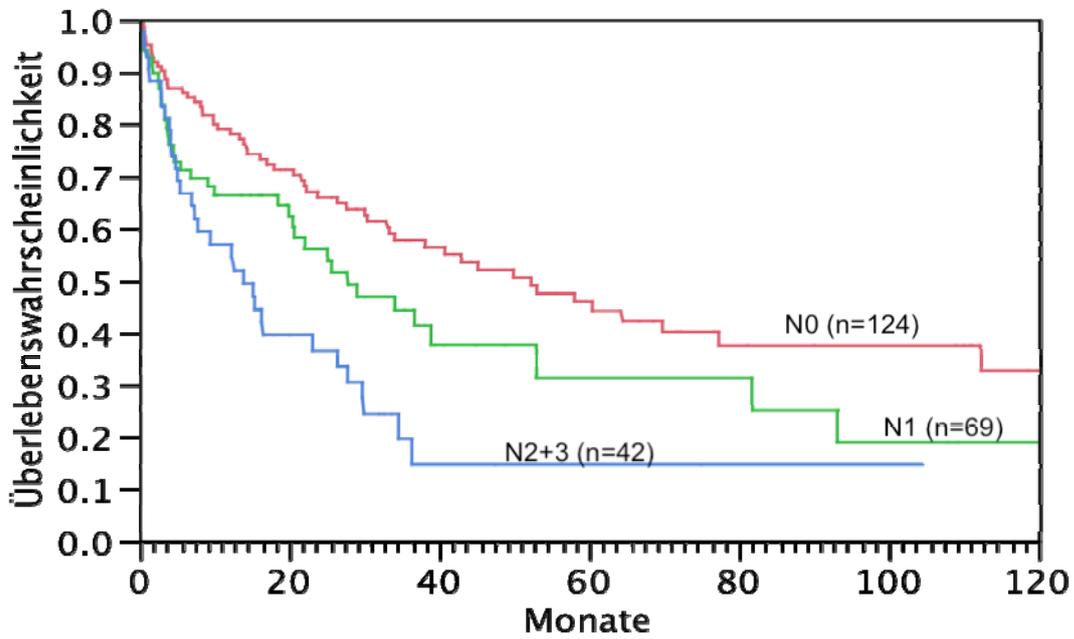


Abbildung 9B:

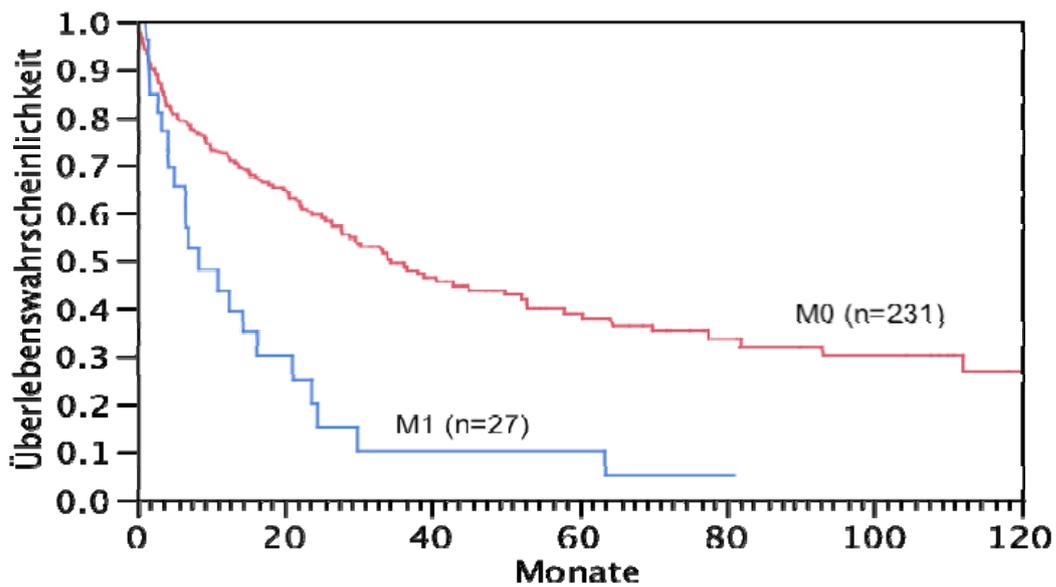
pN Stadium (2+3 kombiniert)



$p < 0.0001$

Abbildung 9C:

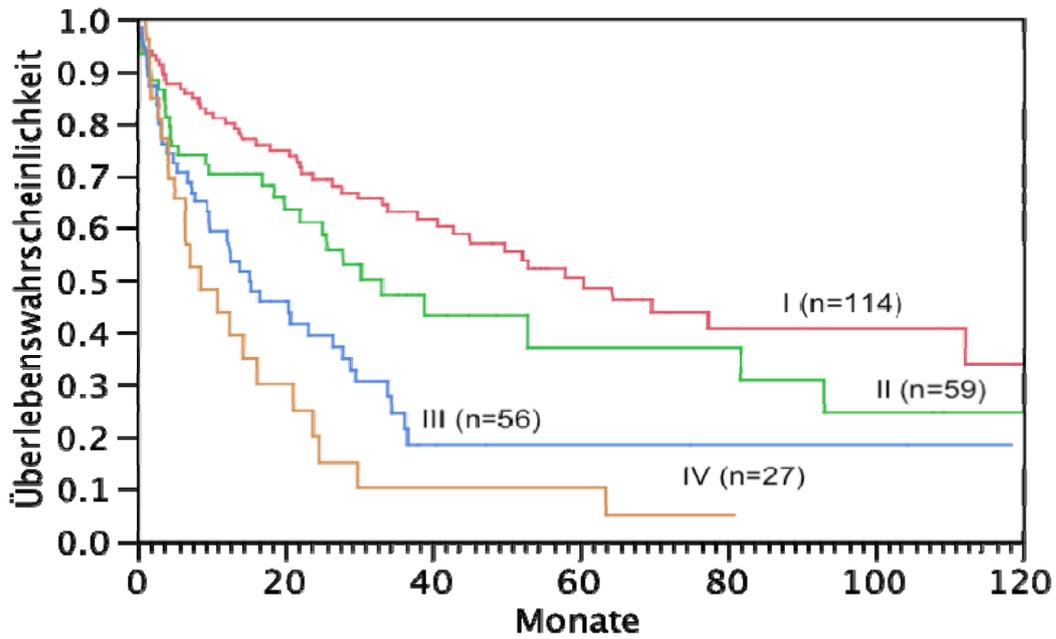
Fernmetastasen (pM)



$p < 0.0001$

Abbildung 9D:

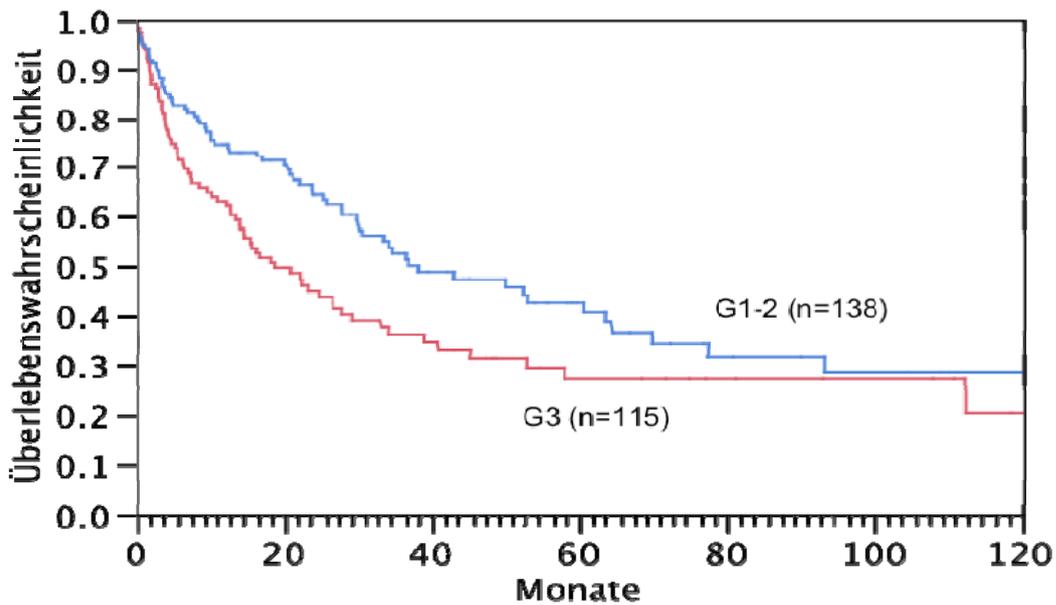
UICC Stadium



$p < 0,0001$

Abbildung 9E:

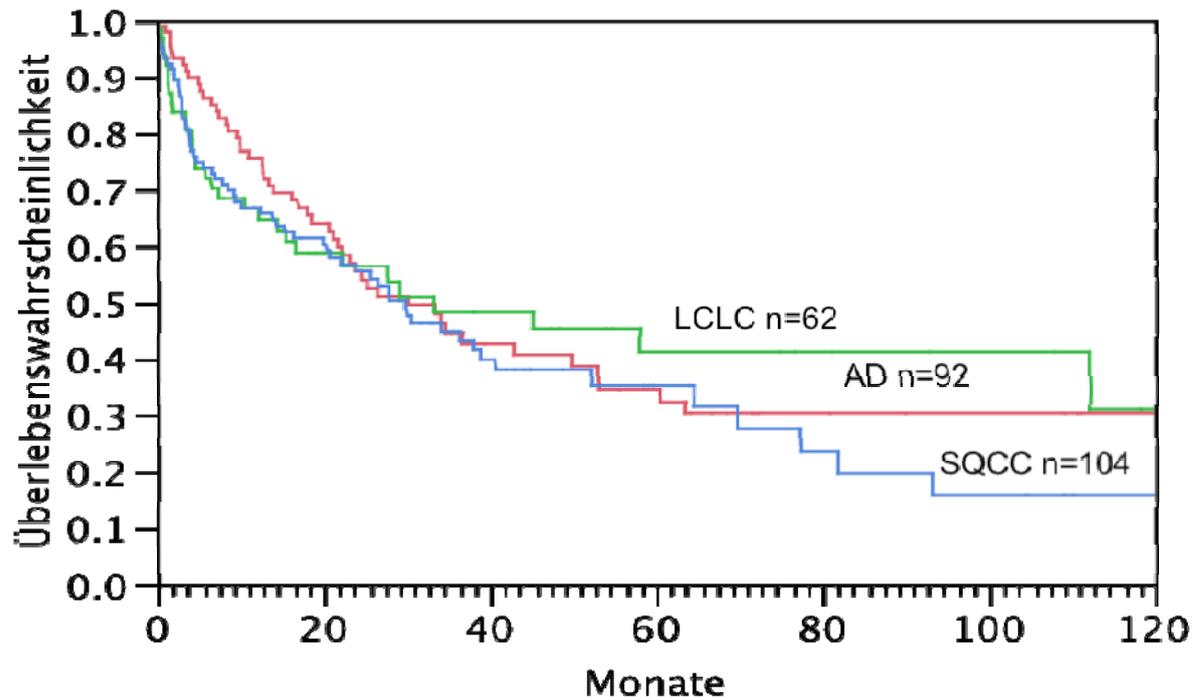
Differenzierung (G)



$p = 0,0179$

Abbildung 9F:

Histologischer Subtyp



$p=0,5897$

3.2. Technische Aspekte

Der Gewebearray (TMA) wurde *HER2* hybridisiert. Insgesamt konnten 526 Tumoren mittels FISH ausgewertet werden. Die übrigen Tumore konnten nicht ausgewertet werden. Dies lag daran, dass entweder entsprechendes Gewebe auf dem TMA fehlte, nicht genügend Tumorzellen nachzuweisen waren oder die Hybridisierungsqualität ungenügend war. Es bestand kein Anlass, die Zahl der auswertbaren Tumoren durch wiederholte Reaktionen unter dann anderen Begleitumständen zu erhöhen, da die absolute Anzahl interpretierbarer Fälle als groß genug erachtet wurde, um den Zweck dieser Studie zu erfüllen. Beispiele erfolgreicher *HER2* Hybridisierungen sind in den Abbildungen 10A und 10B dargestellt.

Die immunhistochemische Untersuchung gelang an 531 Tumoren. Die übrigen Tumoren waren nicht interpretierbar aufgrund abgeschwommenen Gewebes auf dem TMA oder nicht ausreichender Tumorzellen. Beispiele interpretierbarer Tumorproben bei positiver und negativer Immunhistochemie sind in den Abbildungen 10C und 10D dargestellt.

Abbildung 10A: FISH, *HER2* amplifiziert

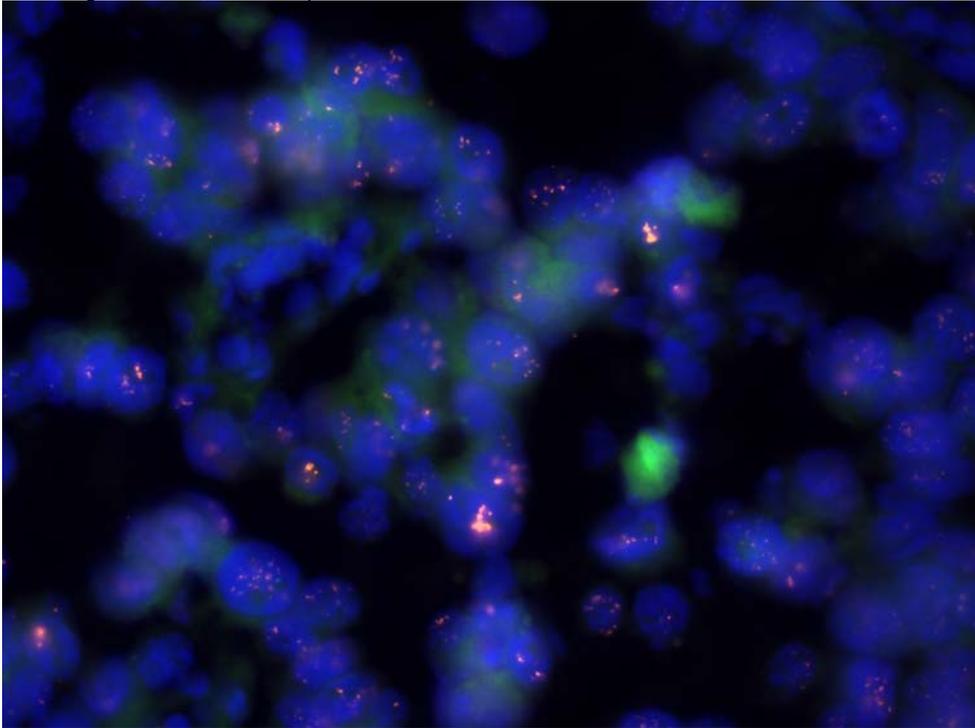


Abbildung 10B: FISH, *HER2* nicht amplifiziert

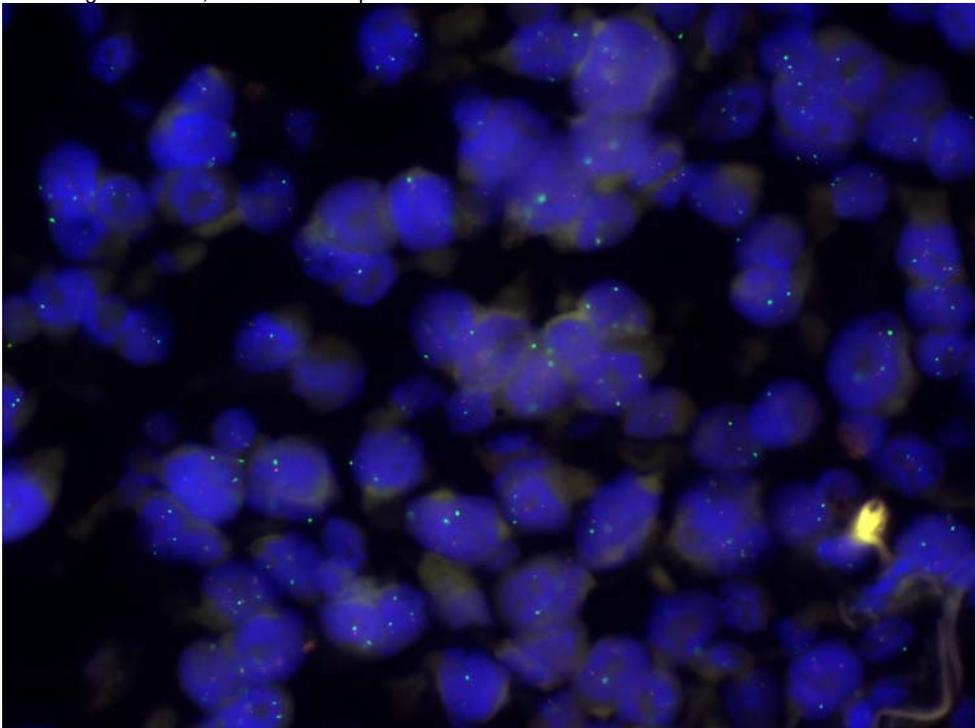


Abbildung 10C: positive HER2 IHC

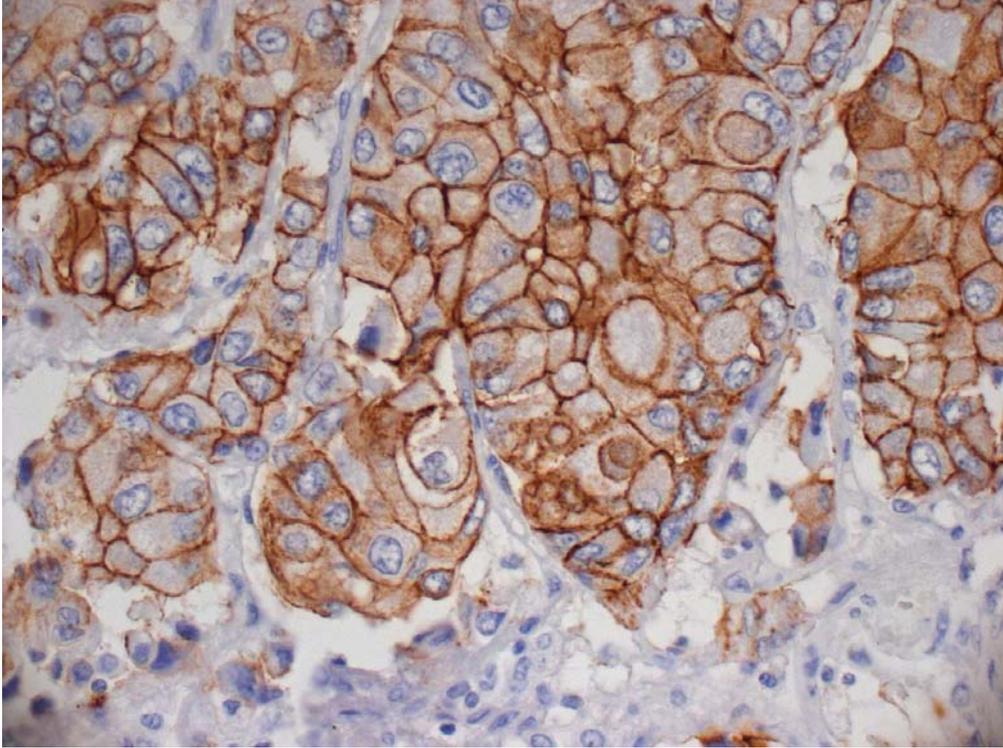
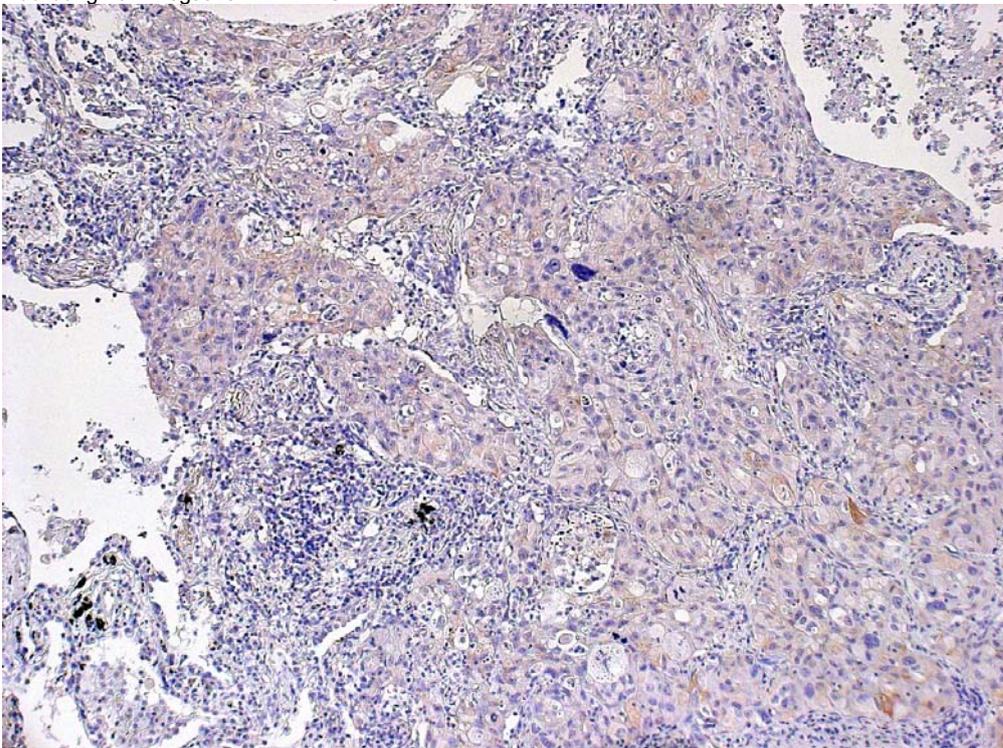


Abbildung 10D: negative HER2 IHC



3.3. HER2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die *HER2* Genkopieanzahl war in 526 Karzinomen interpretierbar. Unser Kriterium für *HER2* Amplifikation waren eine *HER2* zu Centromer17-Signalratio von ≥ 2 und das Vorliegen von ≥ 4 Gensignalen. Eine niedriggradige (low-level) Amplifikation wurde definiert als eine *HER2* zu Centromer17-Signalratio von > 2 und einer Anzahl von < 10 Gensignalen. Dementsprechend wurde eine hochgradige (high-level) Amplifikation durch eine Ratio von > 2 und eine Anzahl von > 10 Gensignalen definiert.

HER2 Amplifikation konnte in 17 Karzinomen (3,2%) nachgewiesen werden. Darunter konnten 10 Fälle (1,9%) mit einer hochgradigen Amplifikation (*HER2* Genkopieanzahl ≥ 10) detektiert werden.

Eine hochgradige Amplifikation war signifikant häufiger in Adenokarzinomen (4,2%) als in Plattenepithelkarzinomen ($p=0,0051$) zu finden. Dabei konnte eine signifikante Assoziation zwischen einer hochgradigen *HER2* Amplifikation und einer schlechten Differenzierung (G3) in Adenokarzinomen ermittelt werden ($p=0,0238$). Insgesamt 12,3% der schlecht differenzierten Adenokarzinome wiesen eine *HER2* Amplifikation auf (sowohl hoch- als auch geringgradige Amplifikation). Eine hochgradige Amplifikation konnte innerhalb einer Subgruppe von 57 schlecht differenzierten Adenokarzinomen (G3) mit einer Häufigkeit von 10,5% detektiert werden.

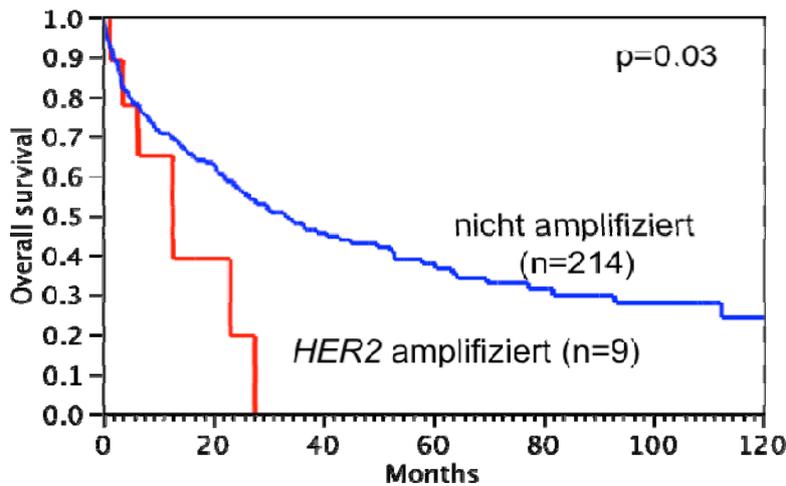
HER2 Amplifikation war demgegenüber nicht assoziiert mit Tumorstadium, Lymphknotenstatus oder Metastasenbildung. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Klinikopathologische Eigenschaften (FISH):

| | | Anzahl | auswertbar | Geringgradige Amplifikation | Hochgradige Amplifikation | p-Wert |
|-------------------|------------------------|-------------|------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|
| Alle Tumore | | 590 | 526 | 7 (1,3%) | 10 (1,9%) | |
| Histologie | Adenokarzinom | 219 (37,1%) | 190 | 4 (2,1%) | 8 (4,2%) | $p=0.0008^{**}$ |
| | Plattenepithelkarzinom | 250 (42,4%) | 227 | 0 | 1 (0,4%) | |
| | Großzelliges Karzinom | 121 (20,5%) | 109 | 3 (2,8%) | 1 (0,9%) | |
| Differenzierung* | G1 | 14 (2,4%) | 12 | 0 | 0 | $p=0.1036$ |
| | G2 | 339 (57,5%) | 302 | 3 (1,0%) | 3 (1,0%) | |
| | G3 | 116 (19,7%) | 103 | 1 (1,0%) | 6 (5,8%) | |
| Stadium | pT1 | 168 (28,5%) | 145 | 1 (0,7%) | 1 (0,7%) | $p=0.4029$ |
| | pT2 | 314 (53,2%) | 287 | 4 (1,4%) | 7 (2,4%) | |
| | pT3 | 50 (8,5%) | 47 | 0 | 1 (2,1%) | |
| | pT4 | 50 (8,5%) | 41 | 2 (4,9%) | 1 (2,4%) | |
| | pTX | 8 (1,4%) | 6 | 0 | 0 | |
| Lymphknotenstatus | pN0 | 257 (43,6%) | 223 | 2 (0,9%) | 4 (1,8%) | $p=0.0660$ |
| | pN1 | 159 (26,9%) | 144 | 3 (2,1%) | 0 | |
| | pN2 | 106 (18,0%) | 100 | 0 | 4 (4,0%) | |
| | pN3 | 19 (3,2%) | 17 | 0 | 1 (5,9%) | |
| | pNX | 49 (8,3%) | 42 | 2 (4,8%) | 1 (2,4%) | |
| Fernmetastasen | pM1 | 33 (5,6%) | 26 | 0 | 0 | $p=0.4163$ |
| | pMX | 557 (94,4%) | 500 | 7 (1,4%) | 10 (2,0%) | |

Patienten mit *HER2* Amplifikation wiesen eine signifikant geringere Überlebenszeit auf im Vergleich mit Patienten mit unauffälligem *HER2* Status (Abbildung 11, $p=0,03$).

Abbildung 11: Verhältnis zwischen *HER2* Amplifikation und Überlebenszeit (Kaplan-Meier Überlebenskurve)



3.4. HER2-Immunhistochemie (IHC)

Eine immunhistochemische Untersuchung des HER2 Proteins konnte an 531 Karzinomen erfolgen. Die übrigen Tumore wurden von der Untersuchung ausgeschlossen entweder aufgrund mangelhaften Gewebes oder aufgrund fehlender oder nicht eindeutiger Tumorzellen. Eine mäßig oder stark positive immunhistochemische Reaktion konnte in 10% der Fälle (53/531) detektiert werden (40x2+ und 13x3+). Diese zeigte sich signifikant häufiger in Adenokarzinomen als in Plattenepithelkarzinomen ($p=0,0016$). Eine positive Testung war dabei gehäuft bei schlecht differenzierten Karzinomen zu finden. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Klinikopathologische Eigenschaften (IHC):

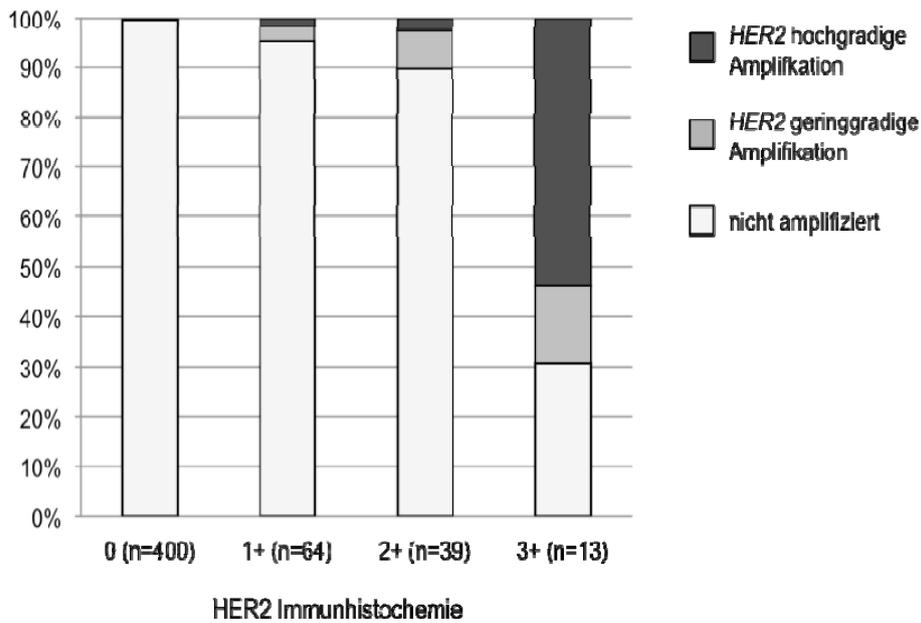
| | | auswertbar | 1+ | 2+ | 3+ | p-Wert |
|-------------------|------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------------|
| Alle Tumore | | 531 | 65 (12,2%) | 40 (7,5%) | 13 (2,4%) | |
| Histologie | Adenokarzinom | 193 | 35 (18,1%) | 20 (10,4%) | 7 (3,6%) | $p<0.0001^{**}$ |
| | Plattenepithelkarzinom | 227 | 18 (7,9%) | 10 (4,4%) | 1 (0,4%) | |
| | Großzelliges Karzinom | 111 | 12 (10,8%) | 10 (9,0%) | 5 (4,5%) | |
| Differenzierung* | G1 | 13 | 1 (7,7%) | 1 (7,7%) | 0 | $p=0.03240$ |
| | G2 | 304 | 35 (11,5%) | 19 (6,3%) | 4 (1,3%) | |
| | G3 | 103 | 17 (16,5%) | 10 (9,7%) | 4 (3,9%) | |
| Stadium | pT1 | 145 | 11 (7,6%) | 11 (7,6%) | 0 | $p=0.0180$ |
| | pT2 | 288 | 39 (13,5%) | 25 (8,7%) | 12 (4,2%) | |
| | pT3 | 47 | 8 (17,0%) | 2 (4,3%) | 1 (2,1%) | |
| | pT4 | 45 | 6 (13,3%) | 2 (4,4%) | 0 | |
| | pTX | 6 | 1 (16,7%) | 0 | 0 | |
| Lymphknotenstatus | pN0 | 228 | 28 (12,3%) | 18 (7,9%) | 8 (3,5%) | $p=0.0109$ |
| | pN1 | 146 | 17 (11,6%) | 6 (4,1%) | 0 | |
| | pN2 | 99 | 16 (16,2%) | 11 (11,1%) | 4 (4,0%) | |
| | pN3 | 18 | 0 | 1 (5,6%) | 1 (5,6%) | |
| | pNX | 40 | 4 (10,0%) | 4 (10,0%) | 0 | |
| Fernmetastasen | pM1 | 27 | 3 (11,1%) | 0 | 0 | $p=0.1119$ |
| | pMX | 504 | 62 (12,3%) | 40 (7,9%) | 13 (2,6%) | |

3.5. HER2 Amplifikation vs. HER2 Überexpression

Immunhistochemie und FISH waren gleichzeitig bei 516 Karzinomen interpretier- und vergleichbar. Überexpression und Genamplifikation waren signifikant miteinander assoziiert ($p<0,0001$, Abbildung 12). Die Assoziation ist besonders ausgeprägt in Fällen mit hochgradiger Amplifikation. Hier zeigt sich eine starke HER2 Überexpression (IHC 3+) in 70% der Fälle.

Amplifizierte Karzinome zeigten eine signifikante HER2 Überexpression (IHC 2+ oder 3+) mit der Ausnahme von 4 Fällen (2 geringgradig- und 2 hochgradig amplifizierte Fälle). Auf der anderen Seite zeigten nur 4 von 39 Karzinomen mit einer IHC 2+ Überexpression auch eine Genamplifikation.

Abbildung 12: *HER2* Amplifikation vs. *HER2* Überexpression



3.6. Heterogenes Auftreten von *HER2* Amplifikation

10 Fälle mit einer hochgradigen Amplifikation wurden für eine Großflächenschnittanalyse ausgewählt. *HER2* Amplifikation konnte in allen Fällen im Bereich der Gewebestanze (für den TMA) nachgewiesen werden. Von diesen zeigten 6 Fälle eine klare Homogenität. In 2 Fällen zeigte sich ein heterogenes Muster mit hoch- und geringgradig amplifizierten Arealen (Abbildung 14B und 14C). In den übrigen 2 Fällen konnten keine weiteren Amplifikationen nachgewiesen werden. Für einen dieser heterogenen Fälle waren 3 zusätzliche Lymphknoten untersuchbar. Dieser Fall zeigte eine hochgradige neben einer geringgradigen Amplifikation im Primarius, während die Metastasen eine homogene niedriggradige Amplifikation aufwiesen. Bei der histologischen Durchsicht der heterogenen Tumore konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Tumorbereichen mit unterschiedlichem *HER2* Amplifikationsstatus gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Heterogenitätsanalyse von *HER2* Amplifikation aller Tumorblöcke von NSCLC:

| Fall Nr. | Histologie | T(n)* | LN(n)* | <i>HER2</i> FISH | | | | <i>HER2</i> IHC (TMA) |
|----------|------------------------|-------|--------|---------------------------|-----------------------------|---------|--|-----------------------|
| | | | | Hochgradige Amplifikation | Geringgradige Amplifikation | negativ | <i>HER2</i> Signale in hochgradig amplifizierten Arealen | |
| 1 | Adenokarzinom | 3 | 2 | 100% | | | 40-50 (Cluster) | 3+ |
| 2 | Adenokarzinom | 4 | 0 | 85% | 15% (Ratio 2.8) | | 10-25 (Cluster) | 0** |
| 3 | Adenokarzinom | 4 | 0 | 100% | | | 15-30 (Cluster) | 3+ |
| 4 | Großzelliges Karzinom | 3 | 0 | 10% | | 90% | 10-20 (Cluster) | 3+ |
| 5 | Adenokarzinom | 3 | 2 | 100% | | | 10-40 (Cluster) | 2+** |
| 6 | Adenokarzinom | 3 | 0 | 100% | | | 20-40 (Cluster) | 3+ |
| 7 | Plattenepithelkarzinom | 2 | 0 | 100% | | | 40-50 (Cluster) | 3+ |
| 8 | Adenokarzinom | 3 | 0 | 15% | | 85% | 30-50 (Cluster) | 3+ |
| 9 | Adenokarzinom | 6 | 3 | 10% | 90% (Ratio 2.2) | | 10-20 (Cluster) | 3+ |
| 10 | Adenokarzinom | 3 | 0 | 100% | | | 10-20 (Cluster) | 1+** |

* analysiertes Tumorgewebe konserviert in Paraffinblöcken von Primärtumoren (T) und Lymphknotenmetastasen (LN)
 ** bestätigt durch Wiederholung der Probe an Großflächenschnitten

Abbildung 13: Heterogenität von *HER2* Überexpression (IHC, Fall 8)

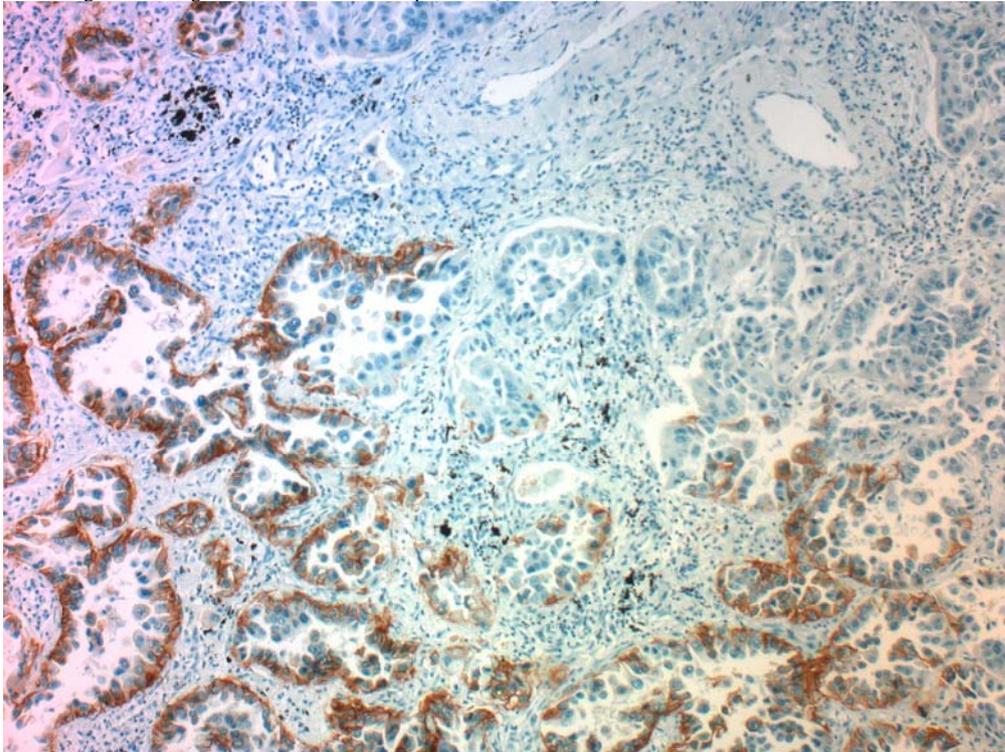
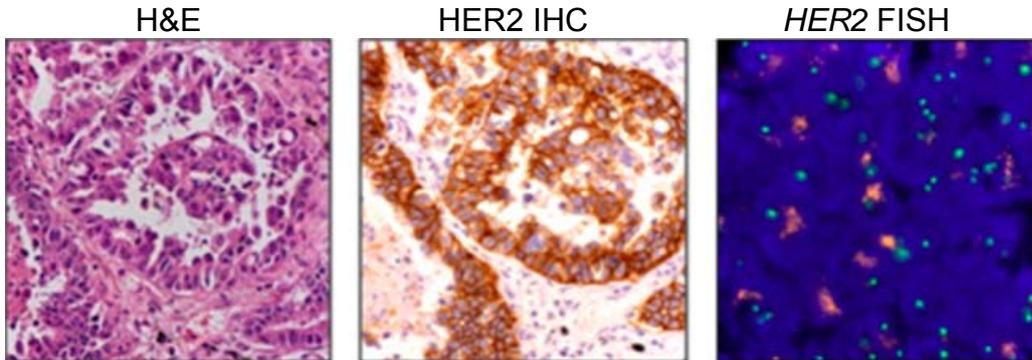


Abbildung 14A-C: H&E-, HER2 Immunohistochemie- und *HER2* FISH Analyse von NSCLCs mit *HER2* Amplifikation
Fallnummer entspricht Tabelle 10

Abbildung 14A, Fall 1:



Hier zeigt sich eine starke homogene Membranfärbung durch die Immunhistochemie. Dementsprechend zeigt sich bei FISH eine *HER2* Amplifikation. Die Tumorzellen weisen Cluster mit orangen Signalen auf (mehr als 50 pro blau angefärbtem Zellkern) und deuten das *HER2* Gen an. Die grünen Signale (1-2 pro Zellkern) stellen die Zentromer-Region von Chromosom17 dar.

Abbildung 14B, Fall 4:

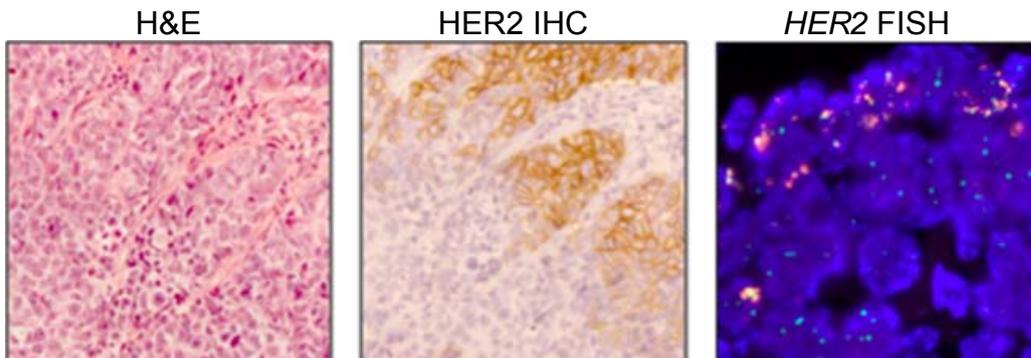
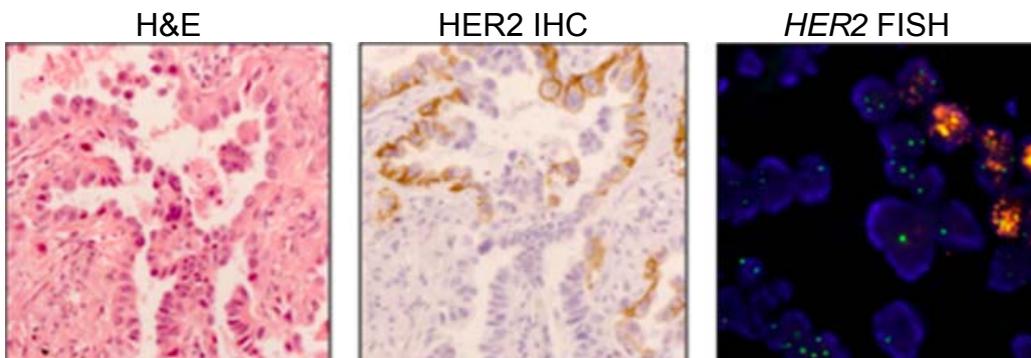


Abbildung 14C, Fall 8:



In Abbildung 14B und C zeigt sich eine starke Färbung mittels IHC nur in einem Teil der Tumorzellen. Entsprechend der FISH-Analyse finden sich Cluster mit orangen Signalen (*HER2* Gen) nur in wenigen Tumorzellen, während andere Tumorzellen 1-3 orange Signale aufweisen und damit eine heterogene Genamplifikation demonstrieren. Die grünen Signale (1-3 pro Zellkern) stellen die Zentromer-Region von Chromosom17 dar.

4 Diskussion

HER2 Amplifikation konnte in 17 von 526 nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen (3,2%) nachgewiesen werden. Darunter gab es 10 Fälle (1,9%) mit hochgradiger Amplifikation. Amplifikation war dabei vorzugsweise häufig bei Adenokarzinomen (6,3%) und großzelligen Karzinomen (3,7%) zu finden. Die Häufigkeit in unserer Studie entspricht der Häufigkeit anderer Studien in denen *HER2* FISH bei Bronchialkarzinomen untersucht wurde (1,2%- 43,2%, Tabelle 6).

Die Neigung von *HER2* Amplifikation bei Adenokarzinomen und die Korrelation von *HER2* Überexpression mit diesem histologischen Subtyp entspricht ebenfalls den Ergebnissen vorausgegangener Studien (Hirsch et al. 2002). Eine signifikante Assoziation zu Tumorstadium oder Metastasenbildung fand sich nicht. Wie in vorausgegangenen Studien beschrieben, konnte aber eine signifikante Assoziation zwischen *HER2* Amplifikation und schlechter Prognose ermittelt werden (Tan et al. 2003).

Innerhalb der Adenokarzinome war eine *HER2* Amplifikation besonders häufig in schlecht differenzierten Karzinomen zu finden. 7 von 57 schlecht differenzierten Adenokarzinomen (12,3%) waren amplifiziert. Darunter gab es 6 Fälle mit hochgradiger Amplifikation. Diese Untergruppe hätte offensichtlich den größten möglichen Nutzen einer *HER2*-gerichteten Therapie.

HER2 Positivität war häufiger mittels Immunhistochemie als mittels FISH zu detektieren. Es gab eine hohe Anzahl an 2+ positiven IHC Fällen bei denen keine Genamplifikation ermittelt werden konnte. Nur 10,3% der Fälle mit einer IHC 2+ Färbung zeigten eine Genamplifikation. Basierend auf diesen Daten lässt sich rückschließen, dass im Gegensatz zum Mammakarzinom einige geringgradig *HER2* überexprimierenden Tumore auch ohne Genamplifikation auftreten. Möglich ist aber auch, dass einige der IHC positiven Färbungen Artefakte darstellen. Es ist auch bekannt, dass unzureichende Formalinfixation und Ethanolkontakt während des technischen Vorganges zu falsch positiven immunhistochemischen Ergebnissen führen kann (Sauter et al. 2009).

HER2 Amplifikation ist Voraussetzung für das Ansprechen auf Trastuzumab bei Mamma- und Magenkarzinomen. Nicht alle Karzinome, die ein Zielprotein exprimieren sprechen gut auf die entsprechende Therapie an. Beispielsweise sprechen nur etwa 50% der *HER2* positiven Mammakarzinome auf Trastuzumab an (Adamo et al. 2007, Dawood et al. 2007). Heterogenität einer *HER2*-

Amplifikation/HER2-Überexpression innerhalb eines Karzinoms und zwischen Primarien und deren Metastasen ist ein möglicher Grund für eine Resistenzentwicklung. Der Primarius wird häufig entfernt und entsprechend untersucht, während die Metastasen im Patienten verbleiben und eventuell auf die Therapie nicht ansprechen. Unsere Daten lassen vermuten, dass eine HER2 Heterogenität häufiger bei Bronchialkarzinomen als bei Mammakarzinomen zu finden ist. Die Untersuchung von 41 verschiedenen Tumorblöcken 10 verschiedener Patienten ließ eine Heterogenität bei 4 von 10 Patienten erkennen (Tabelle 9). Die Anzahl der untersuchten Fälle ist nicht groß. Jedoch lassen die Daten vermuten, dass eine *HER2* Amplifikation nicht automatisch als homogen angesehen werden kann, wenn die *HER2* Testung bei einem Bronchialkarzinom positiv ausfällt. Bei Mammakarzinomen sind heterogene Primarien bzw. Heterogenität zwischen Primarius und seinen Metastasen selten zu finden (Simon et al. 2001). Ein heterogener HER2 Status spricht für eine sich spät in der Karzinogenese von Lungenkarzinomen entwickelnde *HER2* Amplifikation. In diesem Zusammenhang es ist interessant zu bemerken, dass in unserer Studie 2 von 10 Karzinomen Subpopulationen aufwiesen. Diese Subpopulationen wiesen Areale mit geringgradiger Amplifikation neben Arealen mit hochgradiger Amplifikation auf.

Klinische Studien mit Trastuzumab schlugen trotz nachgewiesener HER2 Überexpression bei Bronchialkarzinomen fehl. (Tabelle 7). Zwei Phase II Studien konnten keine überzeugende Wirksamkeit einer Trastuzumab-Therapie aufweisen (Gatzemeier et al. 2004, Langer et al. 2004). In der ersten Studie von Gatzemeier et al. wurden 103 Patienten zur Untersuchung HER2 positiver NSCLC eingeschlossen. 17% der 617 untersuchten Patienten wurden als HER2 positive NSCLC angesehen (IHC 2+, 3+) und nachfolgend randomisiert. Die zweite Studie von Langer et al. schloss alle NSCLC mit detektierbarer HER2 Expression mittels IHC ein (1+, 2+, 3+) welche bei 59% der Patienten gefunden wurde. 53 Patienten wurden in diese Studie aufgenommen. Beide Autoren konnten keinen wirklichen Behandlungsvorteil von Trastuzumab aufzeigen. Zwei kleinere Studien mit ähnlichen Eingangskriterien untersuchten 21 und 24 Patienten. Hier konnte ebenfalls keine Beziehung zwischen HER2 Überexpression und Therapieerfolg aufgezeigt werden (Clamon et al. 2005, Zinner et al. 2004). In den Studien von Gatzemeier et al. und Zinner et al. vermutet man, dass eine Subgruppe von IHC

3+ NSCLC einen Behandlungsvorteil besitzen könnte. Diese Gruppe war jedoch in diesen Studien zu klein, um definitive Informationen bieten zu können.

Das kleine Molekül Lapatinib war zuletzt auch als Monotherapie bei NSCLC getestet worden (Ross et al. 2010). Obwohl die Ergebnisse keine signifikante Anzahl von Tumorregression aufzeigen konnten, zeigte einer von zwei Patienten mit einer retrospektiv getesteten *HER2* Amplifikation ein Ansprechen auf die Therapie.

Die Anzahl untersuchter Fälle ist in unserer Studie zu klein um eine sichere Angabe über die Anzahl homogener hochgradiger *HER2* Amplifikationen machen zu können. Unseren Daten entsprechend läge diese Zahl etwa bei einem Prozent. Obwohl der Anteil von 1% nicht sehr hoch erscheint, sollte berücksichtigt werden, dass allein in den USA und in Europa mehr als 500 000 Bronchialkarzinome jährlich diagnostiziert werden (Ferlay et al. 2010). Darüber hinaus scheint die relative hohe Prävalenz einer *HER2* Amplifikation in schlecht differenzierten Adenokarzinomen weitere klinische Studien einer HER gerichteten Therapie insbesondere in dieser Subgruppe zu rechtfertigen.

Zusammenfassend lässt sich im Rahmen einer gründlichen Untersuchung von 590 NSCLC mittels FDA erprobter Reagentien sagen, dass eine hochgradige *HER2* Amplifikation in 1,9% der NSCLC ermittelt werden konnte. Diese fand sich insbesondere bei schlecht differenzierten Adenokarzinomen. In Anbetracht der Erfahrung mit Mamma- und Magenkarzinomen lassen unserer Daten vermuten, dass diese Patienten geeignete Kandidaten für eine Trastuzumab-Therapie sein könnten. Gescheiterte klinische Versuche haben Patienten basierend auf den Ergebnissen der Immunhistochemie in ihre Studien aufgenommen (Tabelle 7). Wir vermuten daher, dass entsprechend der FISH-Ergebnisse selektierte Patienten der Nutzen einer *HER2*-gerichteten Therapie mit NSCLC zukommen könnte. Entsprechend unseren Daten scheint bei mehr als einem Prozent der Patienten eine homogene hochgradige *HER2* Amplifikation vorzuliegen. Es wäre daher erstrebenswert und gerechtfertigt herauszufinden, ob diese Patienten von einer anti-*HER2* Therapie profitieren würden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

HER2 ist ein potentielles therapeutisches Ziel. Während intratumorale Heterogenität bezüglich einer *HER2* Amplifikation bei Mammakarzinomen selten zu finden ist, findet sie sich häufig bei Blasen- und kolorektalen Karzinomen.

Um die Heterogenitätsrate einschätzen zu können, wurden 590 nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome bezüglich *HER2* Überexpression und *HER2* Amplifikation analysiert. Heterogenität wurde in allen hochamplifizierten Tumoren untersucht. Alle vorhandenen Tumorblöcke der amplifizierten Fälle wurden zusätzlich an Großflächenschnitten auf *HER2* Amplifikation untersucht, um die Verteilung der Genveränderung innerhalb des Tumors (oder auch zwischen Primärtumor und der Metastasen) zu untersuchen.

Eine positive Immunhistochemie (2+, 3+) zeigte sich bei 10% aller Tumore.

HER2 Amplifikation fand sich in 17 (3,2%) der NSCLC inklusive in 10 Fällen mit hochgradiger Amplifikation und dem Auftreten von Genclustern.

HER2 Amplifikation war signifikant assoziiert mit dem histologischen Typ und dem Differenzierungsgrad. Innerhalb der Adenokarzinome war eine *HER2* Amplifikation besonders häufig in schlecht differenzierten Karzinomen zu finden (12,3%). Heterogenität bei gleichzeitiger *HER2* Amplifikation wurde in 4 von 10 Fällen gefunden. Darunter zeigte sich bei 2 Tumoren eine deutliche Mischung aus geringgradiger und hochgradiger Amplifikation. Bei den übrigen 2 Tumoren konnten nicht amplifizierten Tumorareale neben Regionen mit hochgradig amplifizierten Bereichen beobachtet werden.

Wir kommen daher zu der Schlussfolgerung, dass Heterogenität bei amplifizierten Tumoren den Nutzen einer *HER2* gerichteten Therapie in diesen Tumoren limitiert. Zukünftige Studien, die den Nutzen einer *HER2* gerichteten Therapie bei homogen amplifizierten Tumoren untersuchen, scheinen aber gerechtfertigt zu sein.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|--|
| AD | Adenokarzinom |
| AD-sq | Adenosquamöses Karzinom |
| BAC | Bronchoalveoläres Karzinom |
| CT | Computertomographie |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| FDA | US Food and Drug administration |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridsierung |
| Gy | Gray |
| H&E | Hämatoxylin-Eosin |
| HER | Human epidermal growth factor receptor |
| HWZ | Halbwertszeit |
| IASLC | International Association for the Study of Lung cancer |
| IHC | Immunhistochemie |
| IR | Inzidenzrate |
| LCLC | Großzelliges Karzinom |
| LCNEC | Großzelliges neuroendokrines Karzinom |
| LK | Lymphknoten |
| NSCLC | Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| SQCC | Plattenepithelkarzinom |
| SUV | Standardized Uptake Value |
| Tis | Tumor in situ |
| TMA | Tissue Microarray |
| UICC | International Union against cancer |
| vs. | versus |

7. LITERATUR

- Adamo V, Franchina T, Adamo B, Ferraro G, Rossello R, Maugeri Sacca M, Scibilia C, Valerio M R, Russo A. Safety and activity of trastuzumab-containing therapies for the treatment of metastatic breast cancer: our long-term clinical experience (GOIM study). *Ann Oncol* 2007;18 Suppl 6:vi11-15.
- Andersson J, Linderholm B, Bergh J, Elmberger G. "HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumoral heterogeneity and comparison of invasive and in situ components." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12(1):14-20.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer (2005). In: Sadler MJ, Caballero B, Strain J, Hrsg. *Encyclopedia of human nutrition*. London: Academic Press. 272-284.
- Alberg AJ, Ford JG, Sarnet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:29-55.
- Antunes G, Neville E, Duffy J, Ali N. BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax* 2003; 58 Suppl 2:ii29-38.
- Bang YJ, 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, Ruschhoff J, Kang YK. 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(9742):687-697.
- Baselga J. "Current and planned clinical trials with trastuzumab (Herceptin)." *Semin Oncol* 2000; 27(5 Suppl 9):27-32.
- Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." *Cancer Res* 1998;58(13):2825-2831.
- Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang D, Seminara D, Minna J, Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *J Hum Genet* 2004;75:460-474.
- Beaulieu Y, Marik PE. Bedside ultrasonography in the ICU: part 2. *Chest* 2005;128(3):1766-1781.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling." *Nature* 2001;411(6835): 355-365.
- Boffetta P, Jayaprakash V, Yang P, Asomaning K, Muscat JE, Schwartz AG, Zhang ZF, Le Marchand L, Cote ML, Stoddard SM, Morgenstern H, Hung RJ, Christiani DC. Tobacco smoking as a risk factor of bronchioloalveolar carcinoma of the lung: pooled analysis of seven case-control studies in the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Cancer Causes Control* 2011;22(1):73-79.

- Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59(4):803-806.
- Bungay HK, Pal CR, Davies CW, Davies RJ, Gleeson FV. An evaluation of computer tomography as an aid to diagnosis in patient undergoing bronchoscopy for suspected bronchial carcinoma. *Clin Radiol* 2000;55:554-560.
- Bunn PA Jr, Helfrich B, Soriano AF, Franklin WA, Varella-Garcia M, Hirsch FR, Baron A, Zeng C, Chan DC. Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3239-3250.
- Carbone PP, Frost JK, Feinstein AR, Higgins GA, Selawry OS. Lung Cancer: Perspectives and Prospects, *Ann intern Med* 1970;73:1003-1024.
- Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M. HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;354(24):2619-2621.
- Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, Domenichini I, Bartolini S, Ceresoli GL, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Toschi L, Franklin WA, Crino L, Gazdar AF, Bunn PA Jr, Hirsch FR. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23(22):5007-5018.
- Chabner BA, Barnes J, Neal J, Olson E, Myjagic H, Sequist L, Wilson W, Lango DL, Mitsiades C, Richardson P. Targeted Therapies: Thyrosine Kinase Inhibitors, Monoclonal Antibodies and Cytokines. Goodman and Gilman's, The pharmacological Basis of therapeutics, 12th edition. Mc Graw hill medical 2011;62:1731-1732.
- Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization." *Pathol Int* 2008;58(1):17-25.
- Ciampa A, Xu B, Ayata G, Baiyee D, Wallace J, Wertheimer M, Edmiston K, Khan A. HER-2 status in breast cancer: Correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:132-137.
- Clamon G, Herndon J, Kern J, Govindan R, Garst J, Watson D, Green M. Lack of trastuzumab activity in nonsmall cell lung carcinoma with overexpression of erb-B2: 39810: a phase II trial of Cancer and Leukemia Group B." *Cancer* 2005;103(8):1670-1675.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2639-2648.
- Cox G, Vyberg M, Melgaard B, Askaa J, Oster A, O'Byrne KJ. Herceptest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2001;92(4): 480-483.

- Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J Jr, Chien KR, Lee KF. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy." *Nat Med* 2002;8(5):459-465.
- Dawood S, Gonzalez-Angulo AM, Peintinger F, Broglio K, Symmans WF, Kau SW, Islam R, Hortobagyi GN, Buzdar AU. Efficacy and safety of neoadjuvant trastuzumab combined with paclitaxel and epirubicin: a retrospective review of the M. D. Anderson experience. *Cancer* 2007;110(6):1195-1200.
- Deppermann KM. Epidemiology of lung cancer. *Internist* 2011(Berl);52(2): 125-129.
- Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system." *Chest* 2009;136(1):260-271.
- DiPerna CA, Wood DE. Surgical management of T3 and T4 lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(13 Pt 2):5038s-5044s.
- Doll R, Peto R, Boreham J. Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 2004;328(7455):1519.
- Dybdal N, Leibermann 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.
- Erman M, Grunenwald, D, Penault-Llorca F, Grenier J, Besse B, Validire P, Morat L, Girard P, Le Chevalier T, Sabatier L, Soria JC. Epidermal growth factor receptor, HER-2/neu and related pathways in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Lung Cancer* 2005;47(3):315-323.
- Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 5.8.2011
- Gatzemeier U, Groth G, Butts C, Van Zandwijk N, Shepherd F, Ardizzoni A, Barton C, Ghahramani P, Hirsh V. Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15(1):19-27.
- GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. GEKID, 2006.
- Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer." *N Engl J Med* 2006;355(26):2733-2743.

- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lubbe AS, Reinhold T, Spath-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeboller H, Bocking A, Bohle RM, Bruske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gutz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hubner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Muller KM, Muller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schonfeld N, Schutte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H. Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie* 2011;65(1):39-59.
- Gould PM, Bonner JA, Sawyer TE, Deschamps C, Lange CM, Li H. Patterns of failure and overall survival in patients with completely resected T3 N0 M0 non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45(1):91-95.
- Grunenwald D, Le Chevalier T. Re: Stage IIIA category of non-small-cell lung cancer: a new proposal. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(1):88-89.
- Han H, Landrenau RJ, Santucci TS, TUNG MY, Macherey RS, Shackney SE, Sturgis CD, Raab SS, Silverman JF. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 2002;33:105-110.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, Ruschoff J. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res* 2003;9(14):5238-5243.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Bunn PA Jr. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 2002;86(9):1449-1456.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, Dziadziuszko R, Gumerlock P, Chansky K, West H, Gazdar AF, Crino L, Gandara DR, Franklin WA, Bunn PA, Jr. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol* 2007;18:752-760.
- Honeybourne D, Babb J, Bowie et al. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* 2001;56 (Suppl 1):i1-21.
- Hudis CA, Clifford A. Trastuzumab- mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;Jul;5:357(1)39-51.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):341-354.

- Inoue K, Sato M, Fujimura S, Sakurada A, Takahashi S, Usuda K, Kondo T, Tanita T, Handa M, Saito Y, Sagawa M. Prognostic assessment of 1310 patients with non-small-cell lung cancer who underwent complete resection from 1980 to 1993. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116(3):407-411.
- Jacobs T, Gown A, Yaziji H, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1974-1982.
- Junker K, Stachetzki U, Rademacher D, Linder A, Macha HN, Heinecke A, Muller KM, Thomas M. HER2/neu expression and amplification in non-small cell lung cancer prior to and after neoadjuvant therapy. *Lung Cancer* 2005;48(1):59-67.
- Konecny G, Pauletti G, Pelgram M, Untch M, Dandekar S, Aquilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *N Natl Cancer Inst* 2003;95:142-153.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens. *Nat Med* 1998;4(7):844-847.
- Koutsopoulos AV, Mavroudis D, Dambaki KI, Souglakos J, Tzortzaki EG, Drositis J, Delides GS, Georgoulas V, Stathopoulos EN. Simultaneous expression of c-erbB-1, c-erbB-2, c-erbB-3 and c-erbB-4 receptors in non-small-cell lung carcinomas: correlation with clinical outcome. *Lung Cancer* 2007;57(2):193-200.
- Koyi H, Hillerdal G, Branden E. Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumors. *Lung Cancer* 2002;35(1):53-57.
- Kreuzer M, Kreienbock I, Gerken M et al. Risk factors for lung cancer in lung adults. *Am J Epidemiol* 1998;147:1028-1037.
- Langer CJ, Stephenson P, Thor A, Vangel M, Johnson DH. Trastuzumab in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: is there a role? Focus on Eastern Cooperative Oncology Group study 2598. *J Clin Oncol* 2004;22(7):1180-1187.
- Marx AH, Burandt EC, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Atanackovic D, Bokemeyer C, Fiedler W, Terracciano L, Sauter G, Izbicki JR. Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol* 2010;41(11):1577-1585.
- Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brummendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* 2009;40(6):769-777.
- Mayo PH, Doelken P. Pleural ultrasonography. *Clin Chest Med* 2006;27(2):215-227.
- McGarry RC, Song G, des Rosiers P, Timmerman R. Observation-only management of early stage, medically inoperable lung cancer: poor outcome." *Chest* 2002;121(4):1155-1158.
- Medina PJ Goodin S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clin Ther* 2008;30(8):1426-1447.

- Motohiro A, Ueda H, Komatsu H, Yanai N, Mori T. Prognosis of non-surgically treated, clinical stage I lung cancer patients in Japan. *Lung Cancer* 2002;36(1):65-69.
- Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111(6):1710-1717.
- Moy B, Goss PE. Lapatinib-associated toxicity and practical management recommendations. *Oncologist* 2007;12(7):756-765.
- Nagai K, Sohara Y, Tsuchiya R, Goya, T, Miyaoka E. Prognosis of resected non-small cell lung cancer patients with intrapulmonary metastases. *J Thorac Oncol* 2007;2(4):282-286.
- Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res* 2003;9(14):5078-5084.
- Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003;103(1):61-66.
- National institute for Clinical Excellence (NICE), National Collaborating Center for Acute Care. Diagnosis and treatment of lung cancer. London:2005.www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/cg024fullguidline.pdf; Stand10.01.2006.
- Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, Caponigro F, Salomon DS. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets* 2005;6(3):243-257.
- Nowak D, Huber RM. Berufliche Risikofaktoren, Berufskrankheit, arbeitsmedizinische Begutachtung. In: Tumorzentrum München, Hrsg. *Manual der Tumore der Lunge und des Mediastinums*. München: Huber M, 2006
- Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, Tsubota N. Evolution of surgical outcomes for nonsmall cell lung cancer: time trends in 1465 consecutive patients undergoing complete resection. *Ann Thorac Surg* 2004;77(6):1926-1930; discussion 1931.
- Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):385-389.
- Owens MA, Horton BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin breast cancer* 2004;5(1):63-69.
- Paez, JG, Jänne PA, LEE JC, Tracey S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindemann N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fuyii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BR, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." *Science*2004;304(5676):1497-1500.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, 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.

- Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, Cassani B, Miozzo M, Buttitta F, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2003;9(10 Pt 1):3645-3652.
- Pelosi G, Del Curto B, Dell'Orto P, Pasini F, Veronesi G, Spaggiari L, Maisonneuve P, Iannucci A, Terzi A, Lonardoni A, Viale G. Lack of prognostic implications of HER-2/neu abnormalities in 345 stage I non-small cell carcinomas (NSCLC) and 207 stage I-III neuroendocrine tumours (NET) of the lung. *Int J Cancer* 2005;113(1):101-108.
- Perez E, Suman V, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, Flynn PJ, Ingle JN, Visscher D, Jenkins RB. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006;30:3032-3038.
- Pesch B., Jöckel H, Wichmann HE (1995) Luftverunreinigung und Lungenkrebs. *Biometrie und Epidemiologie in der Medizin und Biologie* 26:134-153.
- Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 2000;321(7257):323-329.
- Piccard-Gebhardt M, Procter M, Leyland Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomsson C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Grotzer T, Ward C, Straehle C, Mc Fadden E, Dolci MS, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-1672.
- Porte H, Roumilhac D, Eraldi L, Cordonnier C, Puech P, Wurtz A. The role of mediastinoscopy in the diagnosis of mediastinal lymphadenopathy. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13(2):196-199.
- Press M, Sauter G, Bernsein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: An assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 2005;11:6598-6607.
- Pugh TJ, Bebb G, Barclay L, Sutcliffe M, Fee J, Salski C, O'Connor R, Ho C, Murray N, Melosky B, English J, Vielkind J, Horsman D, Laskin JJ, Marra MA. Correlations of EGFR mutations and increases in EGFR and HER2 copy number to gefitinib response in a retrospective analysis of lung cancer patients. *BMC Cancer* 2007;7:128.
- Rabindran SK. Antitumor activity of HER-2 inhibitors. *Cancer Lett* 2005;227(1):9-23.
- Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, Tsuboi M, Vallieres E, Goldstraw P. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2(7):593-602.

- Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland GEKID (2008) Hrsg Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage Berlin: Robert-Koch-Institut.
- Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H Jr., Stevens CW. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3 Suppl):243S-265S.
- Robinson LA, Wagner H Jr. Treatment of stage IIIA non-small cell lung cancer." *Chest* 2003;123(1 Suppl):202S-220S.
- Romond E, Perez E, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Palk S, Kaufmann PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-1694.
- Ross HJ, Blumenschein GR, Jr., Aisner J, Damjanov N, Dowlati A, Garst J, Rigas JR, Smylie M, Hassani H, Allen KE, Leopold L, Zaks TZ, Shepherd FA. Randomized phase II multicenter trial of two schedules of lapatinib as first- or second-line monotherapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(6):1938-49.
- Saad RS, Liu Y, Han H, Landreneau RJ, Silverman JF: Prognostic significance of HER2/neu, p53, and vascular endothelial growth factor expression in early stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung, *Mod Pathol* 2004;17:1235-1242.
- Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 1993;53(10Suppl):2199-2203.
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1323-1333.
- Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):1966-1975.
- Schwartz AG, Yang P, Swanson GM. Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol* 1996;144:554-562.
- Sihoe AD, Yim AP. Lung cancer staging. *J Surg Res* 2004;117(1):92-106.
- Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Moch H, Wilber K, Schotzau A, Kononen J, Sauter G. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(15):1141-1146.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-182.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science*1989;244(4905):707-712.

- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-792.
- Slamon DJ, Eiermann W, Robert N. et al. Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2 positive early breast cancer patients: Second Interim efficacy analysis (2006). Presented at the 29th Annual San Antonio Breast Cancer symposium, San Antonio, TX, December 17-17
- Sobin LH, Wittekind C. TNM Classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss, 2002.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC, TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. Wiley Blackwell, 2009.
- Soh J, Toyooka S, Ichihara S, Fujiwara Y, Hotta K, Suehisa H, Kobayashi N, Ichimura K, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Date H: Impact of HER2 and EGFR gene status on gefitinib-treated patients with nonsmall-cell lung cancer, *Int J Cancer* 2007;121:1162-1167.
- Spira A, Ettinger DS Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350(4):379-392.
- Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3 Suppl):149S-160S.
- Swensen SJ, Viggiano RW, Midthun DE, Muller NL, Sherrick A, Yamashita K, Naidich DP, Patz EF, Hartman TE, Muhm JR, Weaver AL. Lung nodule enhancement at CT: multicenter study. *Radiology* 2000;214(1):73-80.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. Lungenkrebs ist die vierthäufigste Todesursache. Wiesbaden:2007.
[www./destatis.de/jetspeed/portal/cms/sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/05/PD07_217_232.psml](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/05/PD07_217_232.psml); Stand: 18.11.2007
- Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland. Wiesbaden:2007
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/05/PD07_217_232,templated=renderPrint.psml; Stand: 2009.
- Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S, Beck A, Sait S, Anderson T, Nwogu C, Ramnath N, Loewen G. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2003;12(4):201-211.
- Tolosa EM, Harpole L, McCrory D C. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest* 2003;123 (1 Suppl):137S-146S.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC, World Health Pathology and Genetics of the Tumours of the lung, Pleura Thymus and Heart. Hrsg. Lyon: IARC Press, 2004;9-124.
- Tsourlakis MC (2010) Prävalenz von CCND1-Alterationen bei menschlichen Ösophaguskarzinomen. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg.

- Van Raemdonck DE, Schneider A, Ginsberg RJ. Surgical treatment for higher stage non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1992;54(5):999-1013.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(3):719-726.
- Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, Carpenter G, Gazdar AF, Muthuswamy SK, Arteaga CL. HER2 kinase domain results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell* 2006;10(1):25-38.
- Wichmann HE, Molik B, Pott F, Jöckel KH (1991) Luftverunreinigungen und Lungenkrebs- Ergebnisse einer Pilotstudie. Umweltbundesamt Berlin, Hrsg. Berlin: Erich Schmidt.
- Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer." *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(1):18-43.
- Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. *Int J Clin Oncol* 2011;16(4):287-293.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):127-137.
- Yaziji H, Goldstein L, 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.
- Yoshida K, Tsuda T, Matsumura T, Tsujino T, Hattori T, Ito H, Tahara E. Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989;57(5):285-290.
- Yung RC. Tissue diagnosis of suspected lung cancer: selecting between bronchoscopy, transthoracic needle aspiration, and resectional biopsy. *Respir Care Clin N Am* 2003;9(1):51-76.
- Xie HB, Cornwell R, Grossmann JE, Grossmann JE, Hoerl HD, Kurtycz DF. Bronchoscopy-guided transtracheal and transbronchial fine-needle aspiration biopsy: a 5 year institutional review of 111 cases. *Diagnostic Cytopathology*;2002;27:276-281.
- Zinner RG, Glisson BS, Fossella FV, Pisters KM, Kies MS, Lee PM, Massarelli E, Sabloff B, Fritsche HA Jr., Ro JY, Ordonez NG, Tran HT, Yang Y, Smith TL, Mass RD. Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease. *Lung Cancer* 2004;44(1):99-110.

8. DANKSAGUNG

Die Dissertation wurde am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ein besonderer Dank geht dabei an Prof. Sauter für die Bereitstellung des Themas. Ein weiterer Dank geht an Dr. Grob für die sehr gute Betreuung. Des Weiteren möchte ich PD Dr. Simon für die Geduld danken, wenn es um statistische Fragen ging.

Ich danke Bianca, die mich ermuntert hat mit dem Medizinstudium zu beginnen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Lebensweg gelegt haben.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.