

# **Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf**

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Direktor Professor Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von Privatdozent Dr. med. Jozef Zustin

## **HER-2/neu Analyse an Mammakarzinomknochenmetastasen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharin Boddin  
aus Wismar

Hamburg 2014

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.06.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter**

**Prüfungsausschuss: zweiter Gutachter: PD Dr. R. Simon**

**Prüfungsausschuss: dritter Gutachter: Prof. Dr. V. Müller**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>Seite</b>
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	5-6
1.2 Metastasierung beim Mammakarzinom	7-8
1.3 Der HER-2/neu Rezeptor	9-12
1.4 Therapie des Mammakarzinoms	13-14
1.5 Methoden für den Nachweis der HER-2/neu Genamplifikation und der HER-2/neu Proteinüberexpression	14-18
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1 Gewebeparbeitung - Knochenentkalkung	19
2.2 Herstellung des Tissue Microarray	20-25
2.3 HER-2/neu Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	26-28
2.4 HER-2/neu Immunhistochemie (IHC)	29-31
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Patientendaten	32-35
3.2 Technische Aspekte	35
3.3 Erhobene Daten der HER-2/neu Fluoreszenz in situ Hybridisierung	36
3.4 Erhobene Daten der HER-2/neu Immunhistochemie	37
3.5 Erhobene Daten der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Immunhistochemie im Vergleich	38-39
<b>4. Diskussion</b>	40-45
<b>5. Zusammenfassung</b>	46
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	47-61
<b>7. Danksagung</b>	62
<b>8. Lebenslauf</b>	63
<b>9. Eidesstattliche Erklärung</b>	64

## **1. Einleitung**

Die Einführung von Trastuzumab (Herceptin®) in die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms führte zu einer deutlichen Verlängerung von rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (Baselga et al., 1999; Cobleigh et al., 1999; Slamon und Pegram, 2001; Tuma, 2005). Voraussetzung um Trastuzumab therapeutisch einzusetzen, ist die Selektion von Mammakarzinomen mit einem positiven HER-2/neu-Status. Nur Patientinnen mit einem positiven HER-2/neu-Status sprechen auf eine Behandlung mit Trastuzumab an und können davon profitieren (Baselga et al., 1999; Lebeau et al., 2001; Plosker und Keam, 2006; Tripathy et al., 2004). Aufgrund dessen ist es unerlässlich zuverlässige Verfahren zur Analyse des HER-2/neu-Status sowohl am Primärtumor als auch an seinen Metastasen anzuwenden, da etwa 65% bis 75% der Frauen mit progredientem Brustkrebs im Laufe ihrer Erkrankung Knochenmetastasen entwickeln (Coleman, 2001).

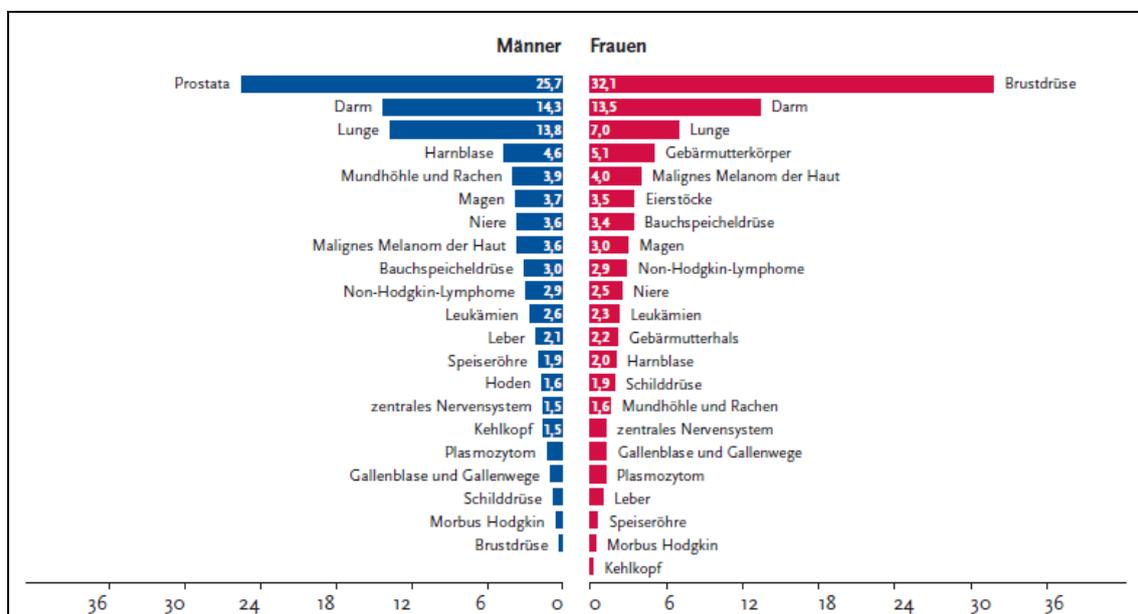
Hierfür stehen zwei etablierte molekulare Untersuchungsmethoden, die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und die Immunhistochemie (IHC) zur Verfügung. Dabei untersucht die Fluoreszenz in situ Hybridisierung die HER-2/neu-Genamplifikation und die Immunhistochemie die HER-2/neu-Proteinüberexpression. Der erfolgreiche Nachweis des HER-2/neu-Status an Gewebeproben des primären Mammakarzinoms ist bereits durch beide Verfahren an in Paraffin eingebettetem und in Formalin fixiertem Gewebe in Studien dokumentiert (Jimenez et al., 2000; Kobayashi et al., 2002; Lebeau et al., 2001; Pauletti et al., 2000; Simon et al., 2001). Nicht bekannt ist hingegen wieviele Knochenmetastasen des Mammakarzinoms HER-2/neu exprimieren. In dieser Studie wird der HER-2/neu-Status an Knochenmetastasen des Mammakarzinoms bestimmt. Da es sich bei Knochen typischerweise um mineralisiertes Gewebe handelt, ist zur weiteren Bearbeitung, Untersuchung und Begutachtung des Materials ein Demineralisierungsschritt Voraussetzung. In der vorliegenden Arbeit werden 149 Mammakarzinomknochenmetastasen in einem Tissue Microarray (TMA) bezüglich ihres HER-2/neu-Status mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie analysiert, dies unter der Fragestellung nach der Anwendbarkeit beider Untersuchungsmethoden an bearbeitetem Knochengewebe. Besondere Beachtung gilt dabei dem möglichen

Einfluss des notwendigen Demineralisierungsschrittes während des Gewebeprozesses auf die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden. Zur Beurteilung der erhobenen Daten werden diese vor dem Hintergrund bereits vorhandener Publikationen über den HER-2/neu-Status an nichtossärem in Paraffin eingebettetem Primärtumorgewebe des Mammakarzinoms interpretiert. Schließlich werden beide Methoden im Vergleich dargestellt und ihre Vor- und Nachteile erörtert.

### 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

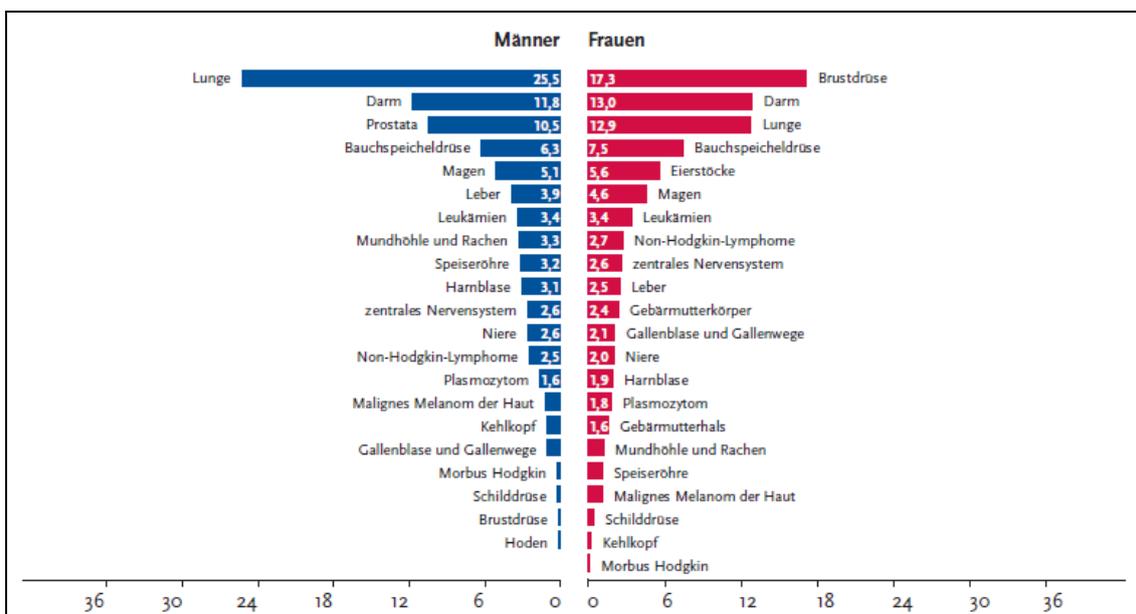
Mit einer Million Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom die häufigste bösartige Neoplasie der Frau weltweit (Ferlay, 2004).

Nach wie vor steht das Mammakarzinom an erster Stelle der Krebsinzidenz in Deutschland (Abbildung 1). Das Robert-Koch-Institut gab für 2008 rund 72.000 Neuerkrankungsfälle an (Robert-Koch-Institut, 2012). Dies entspricht ca. 32% aller weiblichen Krebspatientinnen in Deutschland (Robert-Koch-Institut, 2012). Für das Jahr 2012 werden rund 75.000 Neuerkrankungen erwartet.



**Abbildung 1** Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2007/2008 (Robert-Koch-Institut, 2012).

Ebenso steht bezüglich der Mortalität das Mammakarzinom in Deutschland an erster Stelle der Krebstodesursachen bei Frauen (Abbildung 2). Für das Jahr 2008 dokumentierte das Robert-Koch-Institut 17209 mammakarzinombedingte Sterbefälle, was einem prozentualen Anteil von etwa 17,% aller Krebspatientinnen entspricht (Robert-Koch-Institut, 2012).



**Abbildung 2** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2008 (Robert-Koch-Institut, 2012).

Das mittlere Erkrankungsalter lag für 2008 mit 65 Jahren in der Altersgruppe mit der häufigsten Brustkrebserkrankung zwischen 60 und 70 Jahren. Dennoch wird das Mammakarzinom bei immer jüngeren Patientinnen diagnostiziert. Etwa eine von acht Frauen wird in ihrem Leben an einem Mammakarzinom erkranken. Jede vierte Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre und jede zehnte jünger als 45 Jahre.

Im Jahr 2008 erkrankten zweimal so viele Frauen als noch 1980. Dies ist auf die Einführung des Mammografie-Screeningprogrammes 2005 zurückzuführen. Durch den Fortschritt der adjuvanten Therapiemöglichkeiten sterben heute jedoch trotz der gestiegenen Erkrankungszahlen weniger Frauen als vor 20 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2012).

## **1.2 Metastasierung beim Mammakarzinom**

Bei dem Mammakarzinom handelt es sich um eine sehr komplexe Erkrankung, die durch multiple Risikofaktoren beeinflusst wird - man spricht von einer multifaktoriellen Genese. Zu Beginn der Erkrankung ist das Mammakarzinom eine lokal begrenzte Krankheit. Durch lymphogene und hämatogene Metastasierung kann das Mammakarzinom zu einer systemischen Erkrankung werden.

Der lymphogene Metastasierungsweg ist abhängig von der Tumorlokalisation (Knörr K. et al., 1989). Karzinome im oberen äußeren Quadranten der Mamma metastasieren in die axillären Lymphknoten. Die Ausbreitung medial gelegener Karzinome erfolgt in die Tiefe der Thoraxwand mit Metastasierung in die retrosternalen und supraklavikulären Lymphknoten. Dabei ist die Prognose nicht nur abhängig von der Anzahl der infiltrierten Lymphknoten, sondern auch von ihrer Lokalisation in der Axilla: anatomisch wird das Lymphknotengebiet in der Axilla in drei Level unterteilt. Dabei entspricht Level I dem lateralen Rand des Musculus pectoralis minor. Level II bezieht den lateralen und medialen Rand des Musculus pectoralis minor sowie die interpectoralen Lymphknoten mit ein. Die Lymphknoten im Bereich des Level III liegen medial des medialen Randes des Musculus pectoralis minor, sub- und infraklavikulär sowie apikal. (Bender H.G. et al., 1991)

Bei nodal negativen Patientinnen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 92%. Sind ein bis drei Lymphknoten befallen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 81%. Sind mehr als vier Lymphknoten befallen ändert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 57% (Robbins et al. 1995).

Die hämatogene Metastasierung kann während oder auch nach der lymphogenen Metastasierung erfolgen. Dabei sind zu ca. 70% der Knochen, zu 60% die Lunge und zu 50% die Leber befallen. Ebenfalls zeigt sich eine Beteiligung in Form von Hirnmetastasen (Riede et al. 1993). Die 5-Jahres-Überlebensrate unter systemischer Therapie beträgt etwa 40% (Hu et al 2006, Jaquemier et al. 1998).

Mit 80% sind Metastasen die häufigste Tumormanifestation des Knochens (Christopher D.M. Fletcher, 2002). Dabei metastasieren insbesondere Mammakarzinome, Bronchialkarzinome, Prostatakarzinome, Nierenzellkarzinome und Schilddrüsenkarzinome in das Knochengewebe (Christopher D.M. Fletcher, 2002).

In Abhängigkeit von Tumorstadium, histologischem Typ und Rezeptorstatus entwickeln etwa 65% bis 75% der Frauen mit progredientem Brustkrebs im Laufe ihrer Erkrankung Knochenmetastasen (Coleman, 2001). Bevorzugte Lokalisationen der Knochenmetastasen sind in absteigender Reihenfolge die Wirbelsäule, das proximale Femur, das Becken, die Rippen, das Sternum, der proximale Humerus sowie die Schädelkalotte. Der Altersgipfel für die Manifestation einer ossären Filialisierung liegt in der 6. Lebensdekade. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung Knochenmetastasen liegt durchschnittlich zwischen 9 und 15 Monaten. Dieses kann beim Mammakarzinom im Einzelfall in Abhängigkeit von der Therapie 10 Jahre und länger betragen (Kreienberg et al. 2002).

Indikationen für die Untersuchung des HER-2/neu-Status an Knochenmetastasen in der täglichen Routinediagnostik sind:

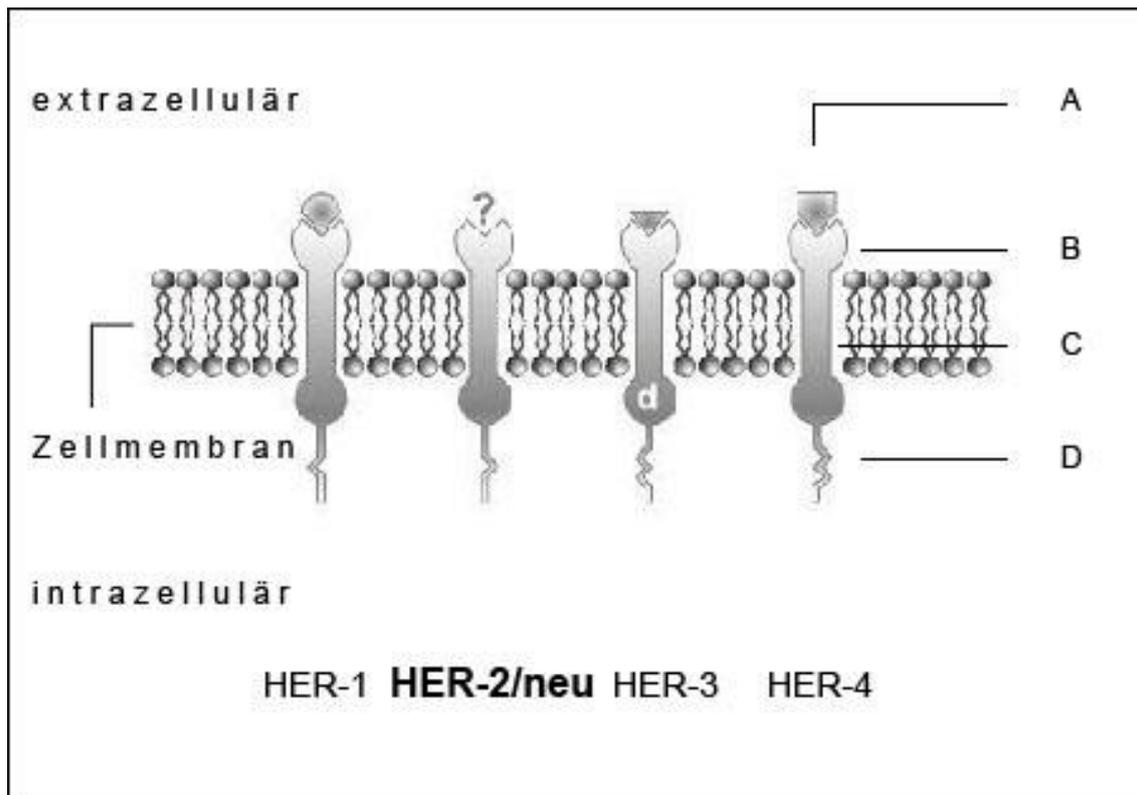
- nicht mehr vorhandenes Primärtumormaterial zum Zeitpunkt der klinischen Relevanz der Metastase,
- die Untersuchung des histologischen Typs der Knochenmetastase bei einem Rezidiv nach vorausgegangener Therapie des primären Mammakarzinoms,
- der veränderte Hormon-Rezeptorstatus im Rahmen der Tumorgenese mit dem Nachweis oder dem Verlust eines positiven HER-2/neu-Status und der daraus resultierenden Konsequenz für die weitere Therapieentscheidung.

### **1.3 Der HER-2/neu – Rezeptor**

Das HER-2/neu-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q12-21.32) lokalisiert und kodiert für einen transmembranalen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 185kD (kiloDalton) mit Tyrosinkinase-Aktivität (Akiyama et al., 1986; Coussens et al., 1985; Kern et al., 1990; Popescu et al., 1989). Dieser humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2 (HER-2), auch als *c-erbB-2* und als *neu oncogene* bezeichnet, wurde erstmals 1987 beschrieben (Slamon et al., 1987).

Neben dem EGF-Rezeptor (erbB1; HER1), erbB3 (HER3) und erbB4 (HER4) gehört der HER-2/neu-Rezeptor zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren der Klasse I (Lupu et al., 1995; Rajkumar and Gullick, 1994; Tzahar et al., 1996).

Der Aufbau aller Rezeptoren der Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist sehr ähnlich; sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Tertiärstruktur und ihrem Funktionsprinzip (Rubin and Yarden, 2001; Tzahar et al., 1996). Wie in Abbildung 3 dargestellt sind die Rezeptoren aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einfachen, transmembranären lipophilen Domäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne mit einem terminalen Aminosäureschwanz aufgebaut (Carpenter, 1987; Klapper et al., 2000; van der Geer et al., 1994). Dabei stellt der terminale Aminosäureschwanz das wichtigste Unterscheidungsmerkmal dar (Dougall et al., 1994).



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der HER-Rezeptorfamilie

?: unbekannt, d: defekt; A: Wachstumsfaktor; B: extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne; C: Transmembrandomäne; D: intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase und Aminosäureschwanz.

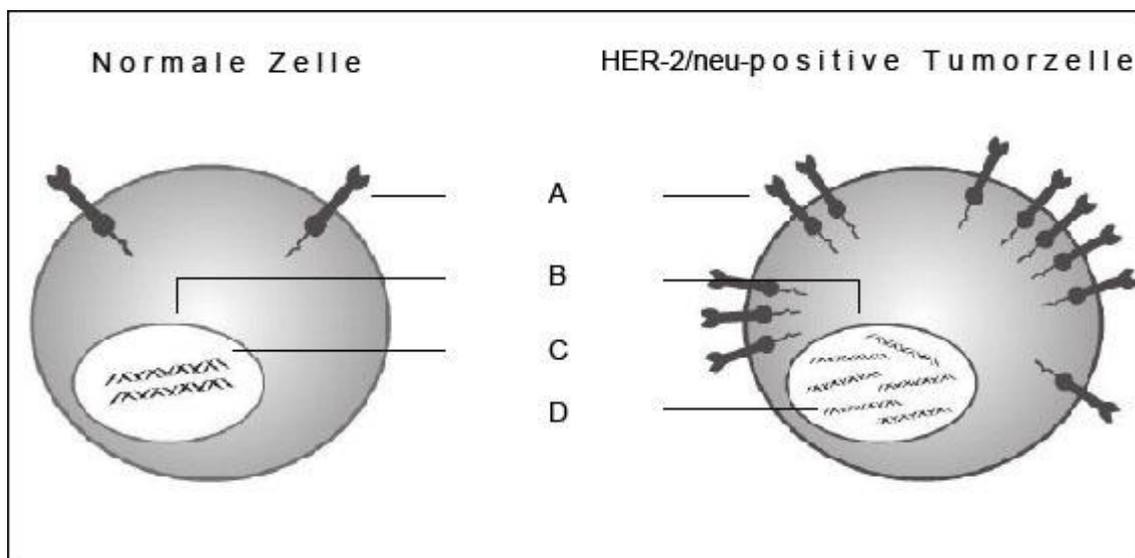
(modifiziert nach G. Schaller (2002) Antikörpertherapie des Mammakarzinoms; 1. Auflage, UNI MED Bremen)

Durch Bindung des entsprechenden Liganden bzw. des Wachstumsfaktors an die extrazelluläre Bindungsdomäne kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren (Alroy and Yarden, 1997). Die folgende Tyrosinkinaseaktivierung bewirkt eine Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne, sodass es zu einer Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade kommt (Abbildung 4) (Carraway et al., 1994; van der Geer et al., 1994).



entspricht einer Amplifikation die Vervielfachung von Genkopien auf der DNA (deoxyribonucleic acid). Durch diesen Schritt kann es zu einer vermehrten Aktivität von Onkogenen kommen. (Grushko et al., 2002). Eine erhöhte Genamplifikation kann somit zu einer vermehrten Expression eines entsprechenden Genproduktes führen.

Eine normale Zelle besitzt zwei nukleäre Kopien des HER-2/neu-Gens auf dem langen Arm von Chromosom 17 und ca. 20.000 bis 50.000 transmembranäre HER-2/neu-Rezeptoren (Schaller, 2002). In Tumorzellen hingegen können diese Zahlen, verursacht durch eine vermehrte Genamplifikation, um das 100fache erhöht sein (Seshadri et al., 1993; Slamon and Pegram, 2001). Abbildung 5 zeigt schematisch eine normale Zelle im Unterschied zu einer HER-2/neu positiven Tumorzelle. Die vermehrte Rezeptordichte auf der Zelloberfläche erhöht die Wahrscheinlichkeit der Dimerisierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren untereinander.



**Abbildung 5** Vergleich einer normaler Zelle und einer HER-2/neu positiven Tumorzelle  
A: HER-2/neu Rezeptor; B: Zellkern; C: HER-2/neu-Protoonkogen; D: HER-2/neu-Genamplifikation.

(modifiziert nach Schaller G. (2002) Antikörpertherapie des Mammakarzinoms; 1. Auflage; UNI MED Bremen)

#### **1.4 Therapie des Mammakarzinoms mit Trastuzumab (Herceptin®)**

HER-2/neu-Genamplifikation und HER-2/neu-Proteinüberexpression treten in 15-25% aller Mammakarzinome auf und sind mit einer schlechteren Prognose, einer höheren Aggressivität des Tumors und Resistenzen gegenüber Hormon- und Chemotherapie für diese Patientinnen verbunden (Al-Kuraya et al., 2004; De Potter et al., 1990; Slamon et al. 1987; Stefano et al. 2004; Todorovic-Rakovic et al. 2007; Zhang et al., 2003).

Gleichzeitig aber ist die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors ein Ansatzpunkt der heutigen erfolgreichen antikörperbasierten Therapie des HER-2/neu-positiven metastasierten Mammakarzinoms mit zum Beispiel Herceptin® (Trastuzumab) (Baselga et al., 1999; Lebeau et al., 2001; Plosker and Keam, 2006; Tripathy et al., 2004).

Mit Trastuzumab, einem rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper (Herceptin®) steht der Therapie des HER-2/neu-positiven metastasierten Mammakarzinoms eine neue Therapieoption zur Verfügung. Die Zulassung, sowohl für den Einsatz als Monotherapie als auch in Kombination mit einer Chemotherapie erfolgte 1998 (M. Untch, 2004). 2006 erfolgte die Zulassung für die adjuvante Therapie (HERA-Studie: Smith et al. 2007). Der Einsatz von Trastuzumab zeigte eine signifikante Verlängerung von rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben der Patientinnen (Baselga et al., 1999; Cobleigh et al., 1999; Slamon and Pegram, 2001). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass der klinische Nutzen einer adjuvanten Anwendung von Herceptin® die Prognose der Patientinnen deutlich positiv beeinflusst (Tuma, 2005).

Entgegen der klassischen onkologischen Chemotherapie mit einer unspezifischen antiproliferativen Wirkung und daraus resultierenden erheblichen Nebenwirkungen, wirkt Herceptin® hoch affin und spezifisch gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors. Die Nebenwirkungen sind gering. Lediglich in Kombination mit Chemotherapeutika kann es zu einer erhöhten Kardiotoxizität mit resultierender Herzinsuffizienz kommen (Slamon et al., 2001). Die Voraussetzung für den Einsatz der Therapie mit Trastuzumab ist

der Nachweis entweder einer HER-2/neu-Genamplifikation oder einer HER-2/neu-Proteinüberexpression.

### **1.5 Methoden für den Nachweis der HER-2/neu-Genamplifikation und der HER-2/neu-Proteinüberexpression**

Aus den oben genannten Gründen wird der HER-2/neu-Status heute routinemäßig in der täglichen Diagnostik des Mammakarzinoms bestimmt, um den möglichst besten Therapieweg für die Patientinnen zu wählen.

Für die Diagnostik des HER-2/neu-Status stehen zwei molekulare Untersuchungsverfahren zum spezifischen Nachweis des HER-2/neu-Gens und des HER-2/neu-Rezeptors zur Verfügung. Zum einen die DNA-Bestimmung, z.B. mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und zum anderen die Bestimmung des HER-2/neu-Rezeptorproteins durch Immunhistochemie (IHC).

Dabei untersucht die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mittels fluoreszenzmarkierter Sonden einzelsträngiger DNA die Vermehrung des Gens auf seinem Genlokus Chromosom 17. Bei dieser Methode kommt es zu einer Zusammenlagerung der einzelsträngigen Sonden mit komplementären Abschnitten auf der Zell-DNA (Hybridisierung). Mittels dieses Verfahrens können Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder einzelne Gene selektiv dargestellt und unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Somit erlaubt die FISH-Technik eine quantitative Aussage über HER-2/neu-Kopien auf der DNA und damit über den Status der HER-2/neu-Genamplifikation.

Der Nachweis der HER-2/neu-Rezeptoren auf der Zelloberfläche hingegen wird mittels der Immunhistochemie bestimmt. Dabei wird das Prinzip der Ausbildung von Antigen-Antikörperkomplexen genutzt. Monoklonal oder polyklonal eingesetzte Antikörper binden an das HER-2/neu-Rezeptorprotein auf der Zelloberfläche. Die dabei entstehenden Antigen-Antikörperkomplexe stellen sich unter dem Lichtmikroskop über eine chemische Farbreaktion dar.

Zahlreiche ältere sowie aktuelle Studien haben beide Verfahren an Primärtumorgewebe des Mammakarzinoms verglichen. Die Mehrheit der

Autoren stellte eine bessere Reproduzierbarkeit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung gegenüber der Immunhistochemie fest (Bartlett et al., 2001; Ciampa et al., 2006; Dowsett et al., 2003; Mass et al., 2005; Sauter et al., 2009; Schmidt et al., 2005; Wolff et al. 2007). In Instituten mit hohen Untersuchungszahlen und standardisierten Abläufen zeigt die Immunhistochemie ebenfalls gute Untersuchungsergebnisse (Perez et al., 2006; Reddy et al., 2006). Generell werden beide Verfahren in erster Linie an Primärtumoren des Mammakarzinoms angewandt.

Für Deutschland sind in der S3-Leitlinie (2012) „Mammakarzinom der Frau: Diagnostik, Therapie und Nachsorge“ Empfehlungen für die pathomorphologische Untersuchung festgelegt. Diese finden im Rahmen der Zertifizierungskriterien eines Brustzentrums durch die Deutsche Krebsgesellschaft (DKG) und die Deutsche Gesellschaft für Senologie (DGS) Anwendung (Internetseite). Hierzu gehören unter anderem:

- Das entnommene Material wird ohne Veränderungen an den Pathologen weitergeleitet (S3-Leitlinie 2012).
- Die Gewebefixation erfolgt in 4%igem neutral gepuffertem Formalin. Dabei sollte die Fixationsdauer sechs Stunden nicht unterschreiten und 48 Stunden nicht überschreiten (ASCO clinical notice 2011, Hammond, et al. 2010).
- Die histologische Klassifikation wird entsprechend invasiver Karzinome nach WHO 2003 vorgenommen (WHO 2003).
- Ebenso erfolgt das Grading invasiver Mammakarzinome nach WHO (Elston und Ellis-Modifikation des Bloom und Richardsen Gratings (Elston et al. 1991)).

In dem schriftlichen Befund sind folgende Prognoseparameter zu dokumentieren: der pTNM-Status (Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung) (Bundred 2001; Carter et al. 1989, NCCN 2011, NZGG 2009, Page et al 1992; Page et al. 1998; Rosen et al. 1991, Rosen al. 1993), der Resektionsrand (R-Klassifikation) und die Sicherheitsabstände (Bundres 2001, Kurtz et al 1989, NCCN 2011, NICE 2009, NZGG 2009; Park, al. 2000),

der histologische Typ (Fisher et al. 1990, NCCN 2011; NZGG 2009), das Grading (Elston et al. 1991; NCCN 2011; NZGG 2009) sowie der Lymphgefäß- und Blutgefäßeinbruch (Colleoni et al. 2007, Gasparini et al. 1994; Kato et al. 2003; NCCN 2011; NZGG 2009).

Schließlich sollen laut S3-Leitlinie für die Entscheidung des adjuvanten Therapieregimes folgende prädiktive Faktoren erhoben werden:

- Der Menopausenstatus für den Einsatz einer antiöstrogenen Therapie (EBCTCG 2000; NCCN 2011).
- Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus für die Entscheidung einer endokrinen Systemtherapie (Bundred 2001; EBCTCG 1992, NCCN 2011, Osborne 1998).
- Sowie den HER-2/neu-Status für die zielgerichtete Anti-HER-2/neu-Therapie (NCCN 2011; NICE 2009; Nothacker et al 2007; NZGG 2009).

Dabei erfolgt die Interpretation des Hormonrezeptorstatus entsprechend den Empfehlungen der ASCO (American Society of Clinical Oncology)/ CAP (College of American Pathologists) -Leitlinien (Hammond, ME et al 2010). In diesem Zusammenhang wird die Verwendung standardisierter Testkits empfohlen. Dies dient der Gewährleistung der Validität und Reproduzierbarkeit der HER-2/neu-Bestimmung (S3-Leitlinie 2012).

Zur Qualitätssicherung der Hormonrezeptor- und HER-2/neu-Bestimmung werden ausdrücklich die interne Testvalidierung, die Verwendung standardisierter Protokolle, interne Kontrollen sowie die regelmäßige erfolgreiche Teilnahme an externen Qualitätssicherungsmaßnahmen (mindestens einmal pro Jahr) empfohlen. Dies zum Beispiel in Form von Ringversuchen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie/ Berufsverband Deutscher Pathologen e.V. (Wasielewski et al. 2008).

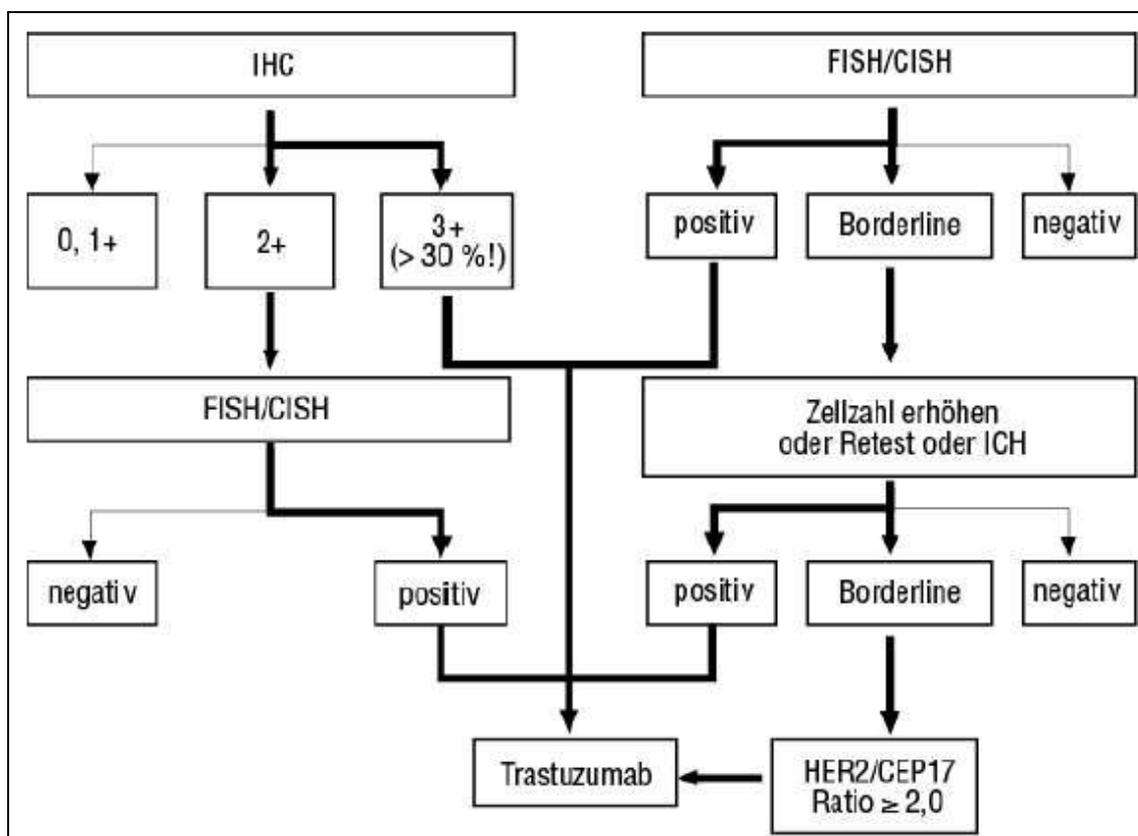
In dieser Arbeit wird von einem positiven HER-2/neu-Status ausgegangen, wenn die Fluoreszenz in situ Hybridisierung einen HER2/ CEP17-Quotienten

(FISH-Ratio) von  $>2,2$  aufweist oder ein immunhistochemischer Score von 3+ vorliegt.

Ein negativer HER-2/neu-Status besteht bei einer FISH-Ratio (HER2/ CEP 17)  $<1,8$  oder einem IHC-Score von 0+ / 1+.

Ein nicht eindeutiger HER-2/neu-Status liegt bei einem HER2/ CEP17-Quotienten zwischen 1,8 und 2,2 oder einem IHC-Score von 2+ vor. In diesen Fällen sind weitere diagnostische Maßnahmen zur Festlegung des HER-2/neu-Status erforderlich.

Abbildung 6 zeigt den empfohlenen Testalgorhythmus und die Interpretation des HER-2/neu-Status nach den Leitlinien der American Society of Clinical Oncology (ASCO), des College of American Pathologists (CAP) und des National Comprehensive Cancer Networks (NCCN 2011; Carlson et al 2006; Wolff et al. 2007a)



**Abbildung 6** Empfohlener HER-2/neu-Testalgorhythmus. (adaptiert an die Leitlinie der American Society of Clinical Oncology (ASCO), des College of American Pathologists (CAP) und des National Comprehensive Cancer Networks (NCCN).

Knochenmetastasen des Mammakarzinoms sind in der bisherigen Literatur bezüglich ihres HER-2/neu-Status wenig untersucht worden. Knochen ist typischerweise mineralisiertes Gewebe und bedarf vor der histologischen Analyse einer Demineralisierung. Hierfür stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. In dieser Studie wurde die EDTA-Entkalkung unter täglicher Röntgenkontrolle des Gewebes angewandt. Dabei handelt es sich um ein hochstandardisiertes und gut kontrollierbares Verfahren.

Es ist bekannt, dass molekulare Untersuchungsmethoden durch vorhergehende Bearbeitungsschritte des Gewebes beeinflusst werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der Demineralisierungsschritt während der Gewebearbeitung Einfluss auf die Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie nehmen könnte. Um die Auswirkungen auf beide Untersuchungsmethoden zu ermitteln, wird in dieser Arbeit eine konsekutive Serie von 149 in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomknochenmetastasen bezüglich ihres HER-2/neu-Status mittels Food and Drug Administration (FDA) zugelassener Reagenzien beider Techniken - Fluoreszenz in situ Hybridisierung (PathVysion/ Firma Abbott) und Immunhistochemie (HerceptTest/ Firma Dako) – untersucht.

## 2. Material und Methoden

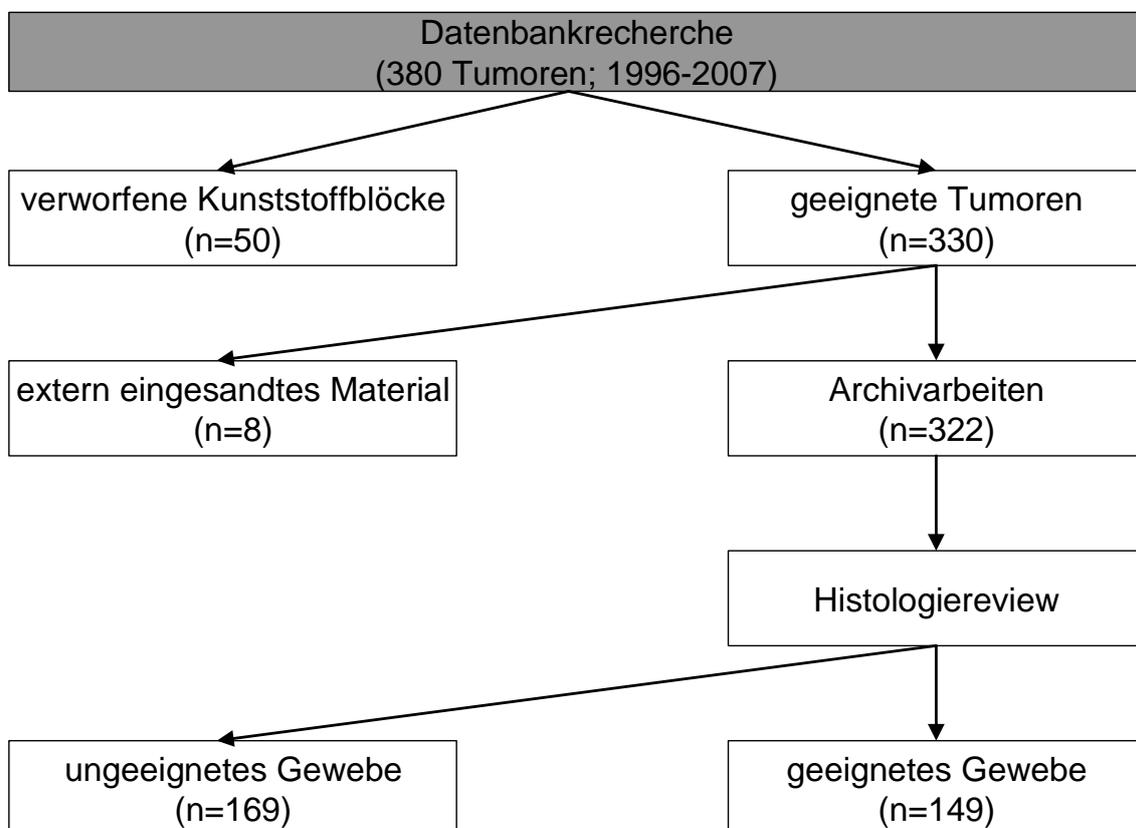
### 2.1 Gewebeparbeitung - Knochenentkalkung

Bei der Bearbeitung von eingesandtem Knochenmaterial sind folgende Schritte üblich: Das eingesandte, in 4%igem Formalin fixierte Gewebe wird zugeschnitten und in Kapseln verbracht. Danach ist es notwendig das Knochengewebe zu demineralisieren. Dieser Schritt erfolgt durch Einbringen des Materials in eine 10%ige EDTA-Lösung (Zusammensetzung: Natriumedetat (Titrplex-III); 25%ige Natronlauge; Aquadest). Zur Unterstützung des Vorganges findet dieser in einem Ultraschallbad (Gerät: Omnilab 300, Bremen) und gleichzeitiger Kühlung (Gerät: Lauda ecoline RE 206; Einstellung 15 Grad Celsius) statt. Der Schritt der Demineralisierung dient der besseren Schnittfähigkeit des Materials und der Qualitätssicherung der späteren histologischen Begutachtung. Ohne diesen Schritt würden Artefakte entstehen, die die mikroskopische Beurteilung stark einschränken. Der Fortschritt des Entkalkungsvorganges wird durch tägliches Röntgen (Gerät: Faxitron X-ray Corporation: Cabinet X-ray System, Lincolnshire, Illinois, USA) kontrolliert. Schließlich wird das fixierte und entkalkte Gewebe in eine aufsteigende Alkoholreihe (80%iges-, 96%iges, 100%iges Ethanol) verbracht, um über ein zweistündiges Xylolbad in Paraffin eingebettet und in Blöcke gegossen (Paraffinblockgießen) zu werden.

Von den ausgehärteten Paraffinblöcken werden auf einem Schlittenmikrotom ca. 4µm messende Schnitte angefertigt. Eine anschließende Behandlung in einem 42 Grad Celsius warmen Wasserbad ist erforderlich, um die Schnitte auf einen Objektträger aufzuziehen, die Schnitte für eine bessere mikroskopische Beurteilung zu strecken und mögliche Artefakte zu vermeiden. Es folgt eine Trocknung in einem Wärmeschrank bei 70 Grad Celsius für 12 Minuten. Anschließend kann die gewünschte Färbemethode am Schnitt angewandt werden, um das eingesandte und bearbeitete Material unter dem Mikroskop zu beurteilen. Dieser Arbeit liegen Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte zugrunde.

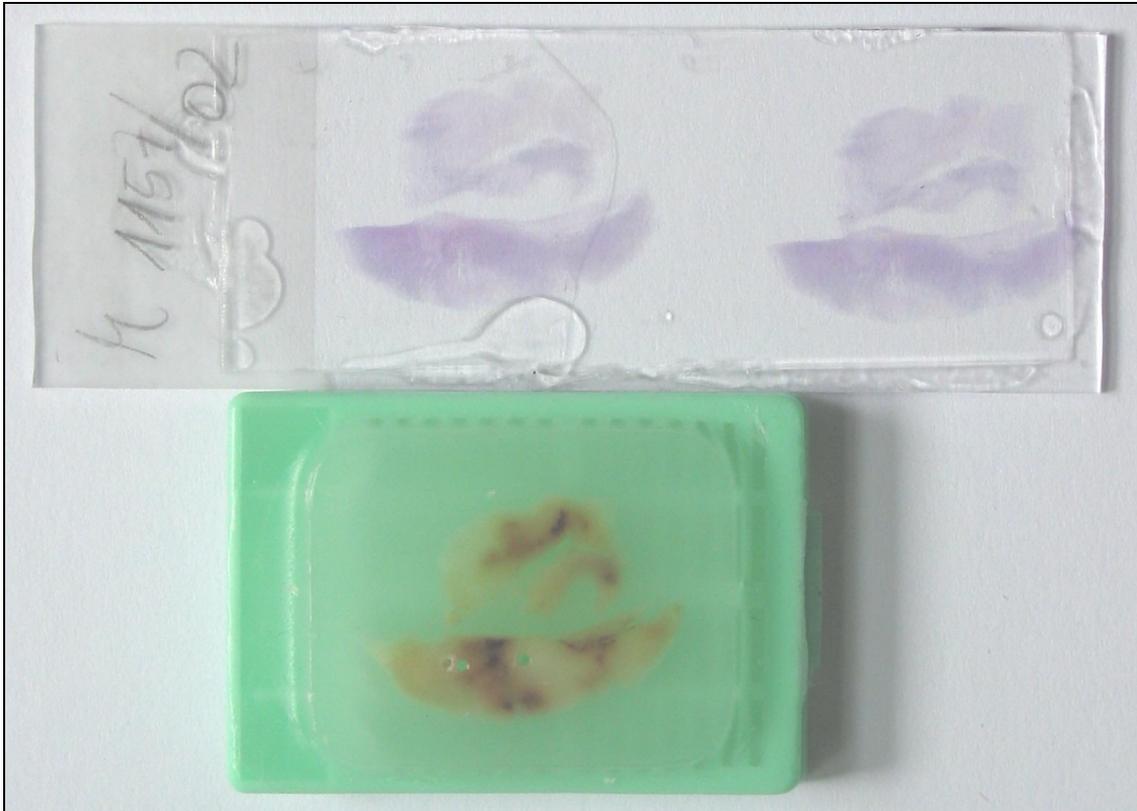
## 2.2 Herstellung Tissue Microarray

Die Datenbankrecherche am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf ergab für einen Zeitraum von elf Jahren (Januar 1996 bis Januar 2007) eine Gesamtzahl von 380 vorhandenen Mammakarzinomknochenmetastasen. Da nur in Paraffin eingebettete Blöcke in die Studie eingeschlossen wurden, reduzierte sich die Gesamtzahl auf 330. Zusätzlich gab es acht extern eingesandte Blöcke, die an die Absender zurückgeschickt worden waren, sodass sich vor den Archivarbeiten eine Gesamtzahl von 322 Blöcken ergab (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Schematische Darstellung der Datenbankrecherche und Archivarbeiten

Alle Paraffinblöcke – im Weiteren als Donorblöcke bezeichnet - und passende Hämatoxilin-Eosin-Schnitte wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie/ Sektion Osteopathologie entnommen (Abbildung 8).



**Abbildung 8** Einzelner Gewebeblock mit passendem Hämatoxilin Eosin – Schnitt.

Nicht vorhandene Schnitte wurden erneut angefertigt. Durch die in Tabelle 1 dargestellten Kriterien reduzierte sich die Anzahl der verwertbaren Blöcke während der Archivarbeiten auf die endgültige Anzahl von 149.

**Tabelle 1** Ausschlusskriterien des Gewebematerials

<b>Kriterium</b>	<b>Anzahl N</b>
zu wenig Tumor auf den H.E.-Schnitten und im Block/ < 0,5 cm <sup>2</sup>	49
Blöcke nicht vorhanden	51
Stanzbiopsien	69

Im histologischen Review durch PD Dr. med. Jozef Zustin (Oberarzt am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) wurden auf den Schnitten repräsentative Tumorareale als Vorbereitung für die folgenden Arbeitsabläufe markiert. Abbildung 9 stellt einen Paraffinblock mit passendem Tumorareal-markierten Schnitt dar.



**Abbildung 9** Einzelner Gewebekblock mit passendem Hämatoxylin Eosin - Schnitt mit Markierung nach dem histologischen Review.

Anhand eines „Punch-files“ – einer Liste aller Präparate mit Koordinaten für den späteren Tissue Microarray (Hammond et al. 2003) - wurden im Institut für Pathologie 0,6mm durchmessende Gewebezylinder im markierten Areal aus den Donorblöcken mittels eines eigens dafür hergestellten Präzisionsinstrumentes (Abbildung 10) herausgestanzt.

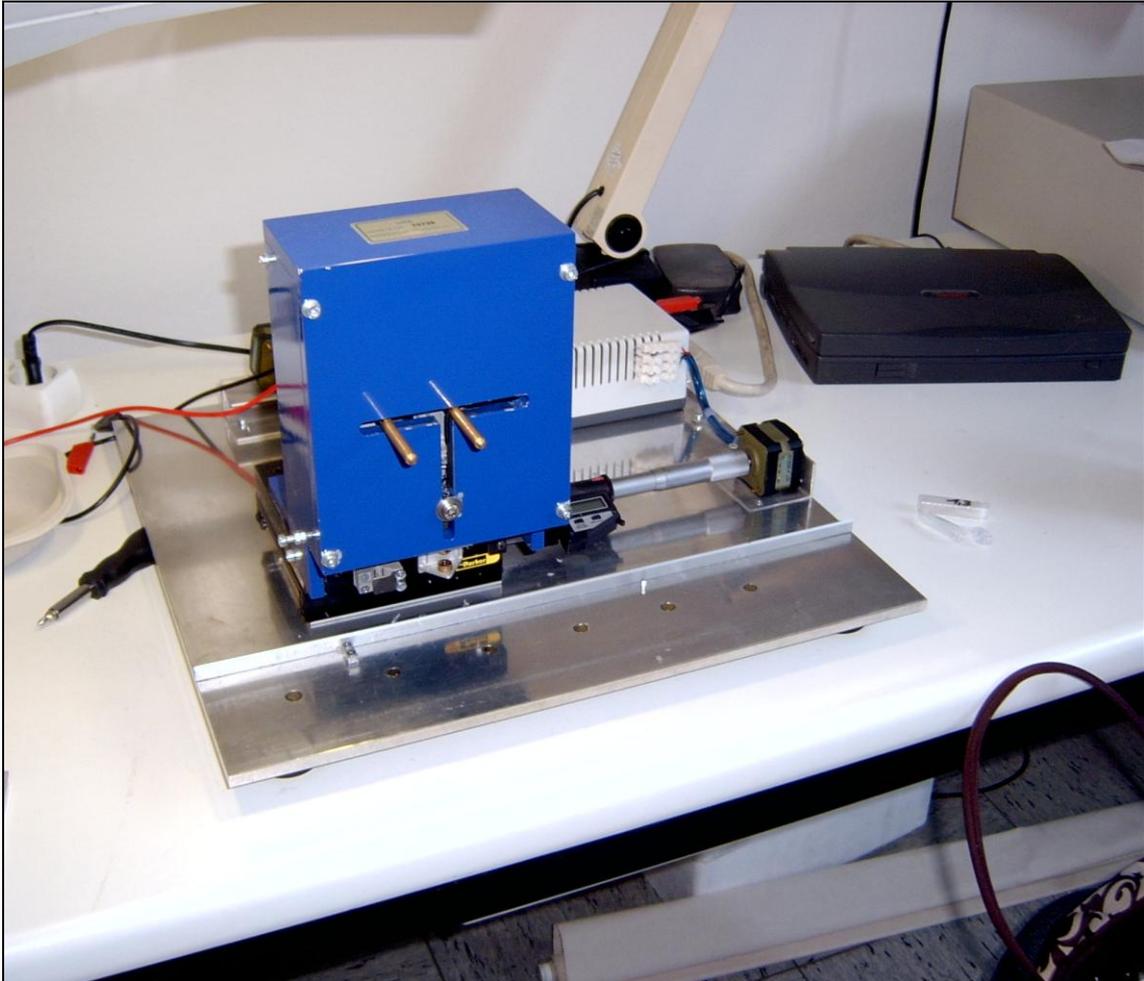


Abbildung 10 Gerät zur Herstellung des Tissue Microarrays

Als Vorlage für den späteren Tissue Microarray diente ein gegossener Paraffinblock (Abbildung 11A), der kein Gewebematerial enthielt. Dieser Block wird im Weiteren als Empfängerblock bezeichnet.

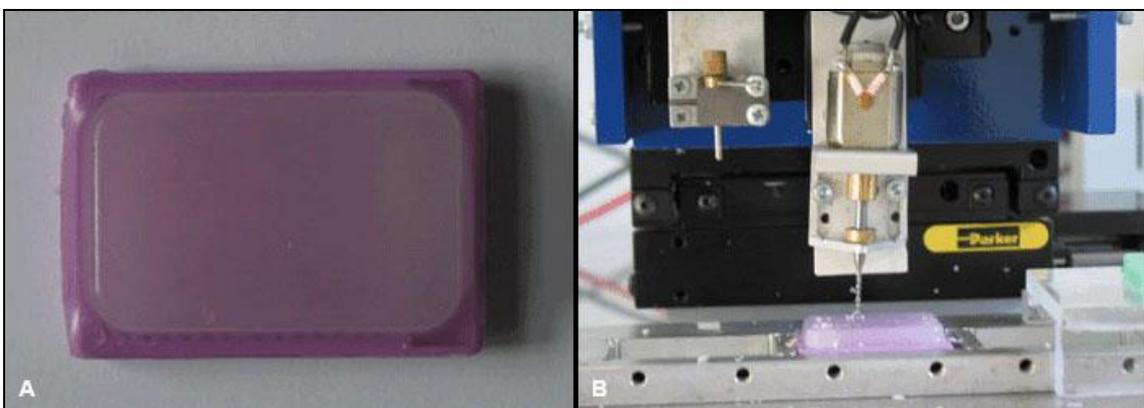
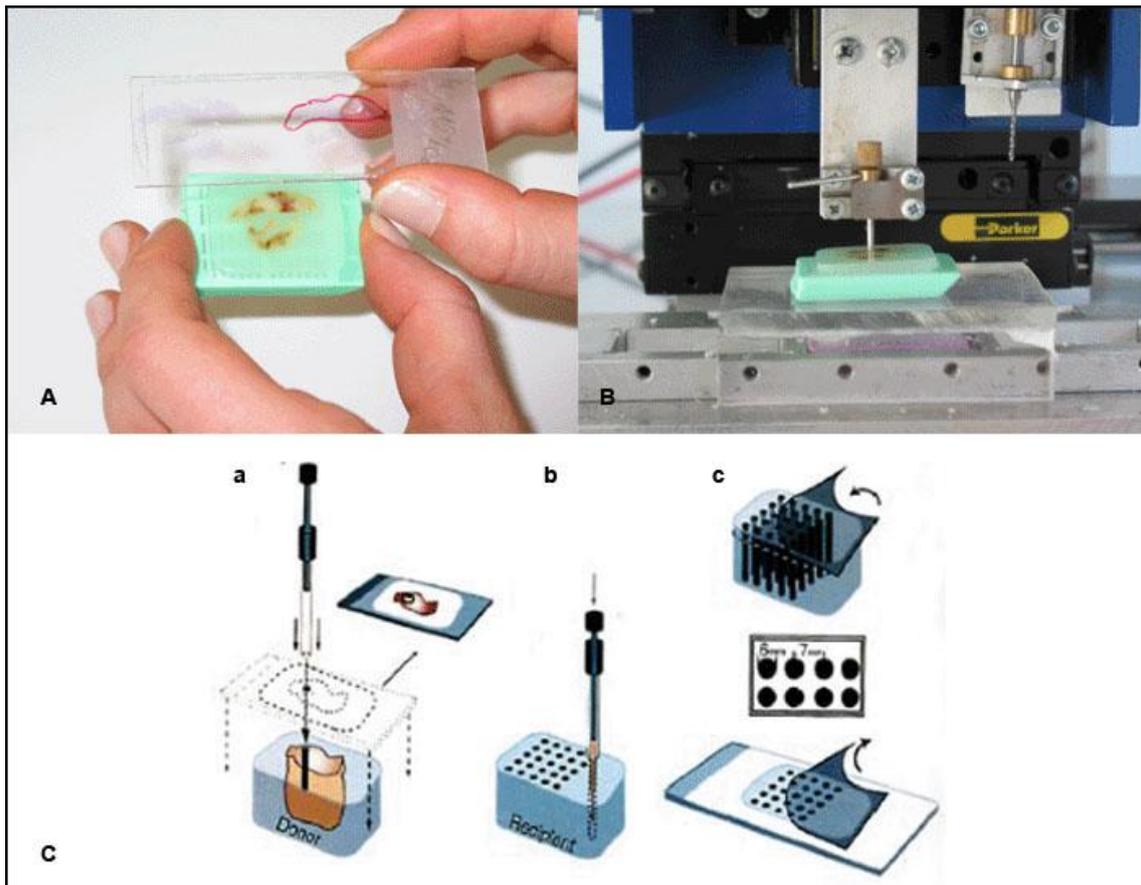


Abbildung 11 A: Nativer Paraffinblock als Vorlage für den späteren Tissue Microarray; B: Bohren eines Loches in den nativen Empfängerblock.

Wie in Abbildung 11B dargestellt, wurde ein Loch pro Donorblock in den Empfängerblock gebohrt. Mittels eines 0,6mm messenden Hohlzylinders wurden aus dem Donorblock Gewebestanzzyylinder entnommen (Abbildung 12B). Diese wurden in das vorgebohrte Areal des Empfängerblockes verbracht. Hilfestellung leistete dabei das zuvor markierte Tumorareal auf dem Schnitt des Donorblockes (Abbildung 12A), um ein größtmögliches Tumolvolumen im späteren Array zu gewährleisten.

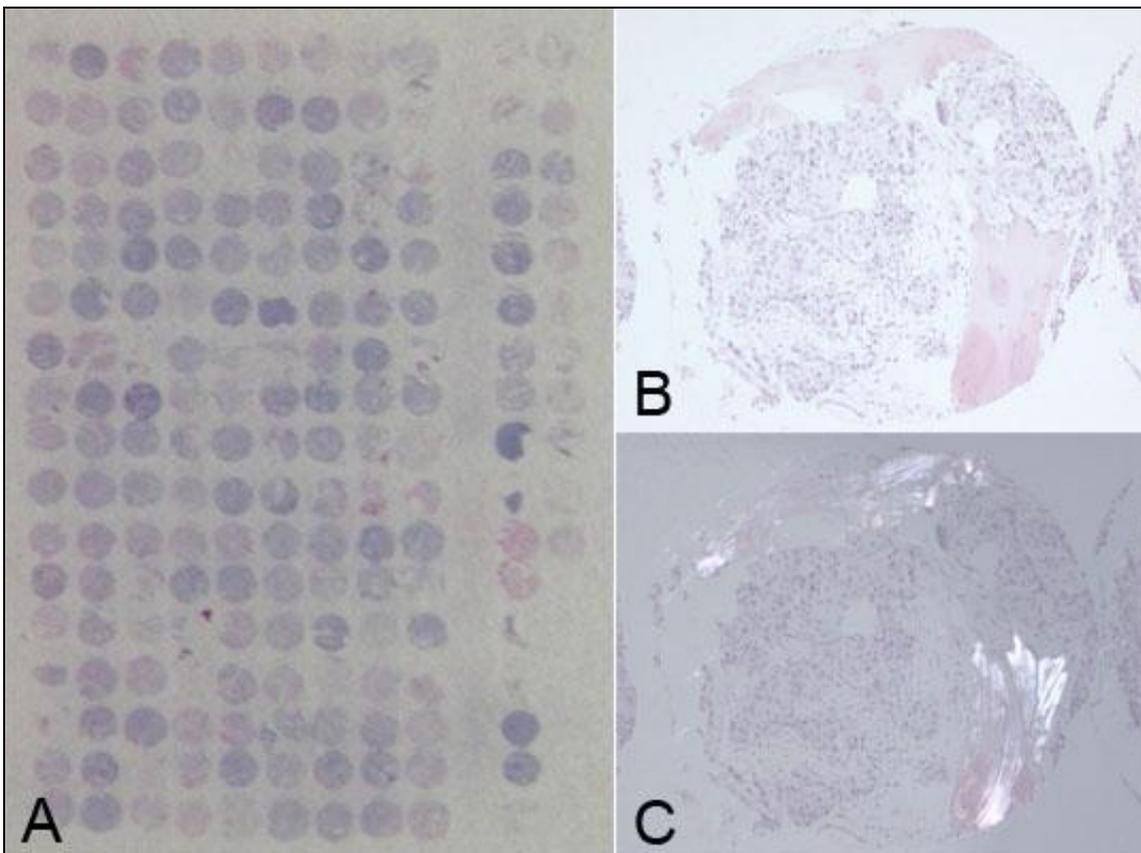


**Abbildung 12** A: Anhalten des markierten Tumorareals an den Donorblock, B: Stanzen eines 0,6 mm messenden Hohlzylinders aus dem Donorblock, C: schematische Darstellung des Tissue Micro Array (a: Entnahme des Stanzzyinders aus dem Donorblock; b: Einbringen des Stanzzyinders in den Empfängerblock; c: Anfertigung eines TMA-Schnittes mittels SectioningAidSystem (Kononen et al., 1998).

Um eine Kontrolle der angewandten Methoden – Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie – zu gewährleisten, wurde Referenzgewebe bzw. Kontrollgewebe in den TMA eingeschlossen. Dabei handelte es sich um gesundes Gewebe, das als Negativkontrolle diente und sich in der späteren Untersuchung HER-2/neu negativ darstellte. Nach einer Datenbankrecherche am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf und der Entnahme aus dem dortigen Archiv bestand das

Kontrollgewebe aus folgenden Komponenten: Herzmuskulatur (n=2), Nierengewebe (n=2), Lungengewebe (n=2), Darmschleimhaut (n=2), Gebärmutter Schleimhaut (n=2), Prostatagewebe (n=2), Lymphknotengewebe (n=2), Hautgewebe (n=2), Tonsillengewebe (n=2), Hodengewebe (n=2), gesundes Brustdrüsengewebe (n=10). Somit ergab sich auf dem Array eine Gesamtzahl von 181 Gewebeprobe (Spots).

Von dem Gesamt-TMA wurden 4µm messende Schnitte – mittels Paraffin Sectioning Aid System (Instrumentics; Hackensack, New Jersey, USA) - angefertigt, um diese für die histologische Beurteilung und die Untersuchung durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie zu nutzen. (Siehe Abbildung 13 A-C)



**Abbildung 13** A: Hämatoxylin Eosin - Schnitt des gesamten Array B: Einzelne Hämatoxylin Eosin gefärbte Knochenmetastase C: polarisationsoptische Darstellung der lamellären Grundstruktur des ursprünglich durch den Tumor infiltrierten Knochens derselben Knochenmetastase.

### **2.3 HER-2/neu Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine molekulargenetische Methode zum gezielten Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen von DNA bzw. RNA (ribonucleic acid). Dabei werden künstlich hergestellte fluoreszenzmarkierte Sonden aus Nukleinsäuren eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisenden Zellnukleinsäuren hybridisieren. Dieses Verfahren findet „in situ“ statt, da der direkte Nachweis an Gewebeschnitten erfolgt.

Für den Nachweis des HER-2/neu-Gens auf Chromosom 17 in der DNA der Zellen in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebematerialien stand in dieser Studie das HER-2 Sonden KIT der Firma Abbott zur Verfügung.

Die Bearbeitung des Gewebematerials erfolgte am ungefärbten Paraffinschnitt des TMA. Dafür war es notwendig den Paraffinschnitt auf einen Superfrost™-Objektträger aufzuziehen. Dieser war mit Organisolon – einem Haftstoff auf der Objektträgeroberfläche - beschichtet, sodass sich das aufgebrachte Gewebe nicht durch die vielen Wasch- und Bearbeitungsschritte vom Objektträger löste. Die Behandlung des Schnittes benötigte zwei Tage, wobei die Angaben des Herstellers als Vorgabe dienten.

Am ersten Tag war zunächst eine Entparaffinierung des Materials notwendig. Dies geschah durch Einbringen des Objektträgers in ein Xylolbad (drei mal zehn Minuten) und dann in ein 96%iges Ethanolbad (zwei mal fünf Minuten). Nach Lufttrocknung wurde die Pretreatment Solution (Pretreatment Reagent; Firma Abbott; gebrauchsfertig) aufgebracht (bei 80 Grad Celsius für 15 Minuten). Das Material wurde dann durch Spülung mit einer Protease-I-Lösung (in 500ml Protease-Buffer 250mg Protease-I (Pepsin) gelöst; Firma Abbott) bei 37 Grad Celsius für 150 Minuten angedaut. Eine anschließende Behandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%ig; 80%ig; 96%ig) für jeweils drei Minuten diente der Entwässerung. Nach einer weiteren Lufttrocknung auf einer Heizplatte (48 Grad Celsius) wurden 10µl Path-Vysion (Firma Vysis-Abbott; Illinois, USA, HER-2/neu (17q11.2-q12) spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde, die mit SpectrumOrange direktmarkiert und zentromerspezifische DNA-Sonde

für Chromosom 17 = CEP – Chromosome Enumeration Probe mit SpectrumGreen direktmarkiert) auf das Gewebe pipettiert, mit einem Deckgläschen bedeckt und abschließend mit Kleber (Rubbercement) versiegelt. Das Material wurde in dieser Form fünf Minuten bei 72 Grad Celsius im Hybrite (Gerät: Statspin®; ThermoBrite™ Firma: Abbott Molecular) denaturiert. Über Nacht wurde der Schnitt im Hybrite bei 37 Grad Celsius inkubiert (Hybridisierungsschritt) um am Folgetag weiterbehandelt zu werden. Zusammenfassend erfolgten am ersten Tag die Denaturierung der DNA und Hybridisierung der spezifischen Gen-Sonden.

Am zweiten Tag der Bearbeitung wurden zunächst der Kleber und die Deckgläschen von dem Schnitt entfernt und in einen Waschpuffer (zweimal SSC (saline sodium citrate/ Natriumzitatpuffer), 0,3%ige NP40; pH 7-7,5 Firma Abbott) bei Raumtemperatur verbracht. Darauf folgte für zwei Minuten ein 72 Grad Celsius warmes Wasserbad um überschüssiges Sondenmaterial zu entfernen. Hierbei sollten drei Minuten nicht überschritten werden, da sonst eine zu starke Denaturierung erfolgen kann. Die Schnitte wurden kurz in einem Wasserbad gewaschen, um dann in Dunkelheit (für 15 Minuten oder länger) zu trocknen. Anschließend wurden 10 µl DAPI (DAPI-I Counterstain 1000ng/ml; Firma Abbott) auf den Schnitt aufgebracht und mit einem Deckgläschen (24mmx46mm) abgedeckt. Dies diente zum einen der gleichmäßigen Materialverteilung und zum anderen dem Schutz des Gewebes. DAPI ist ein Farbstoff, der die DNA blau färbt, sodass die Zellkerne in der späteren Auswertung erkannt werden konnten.

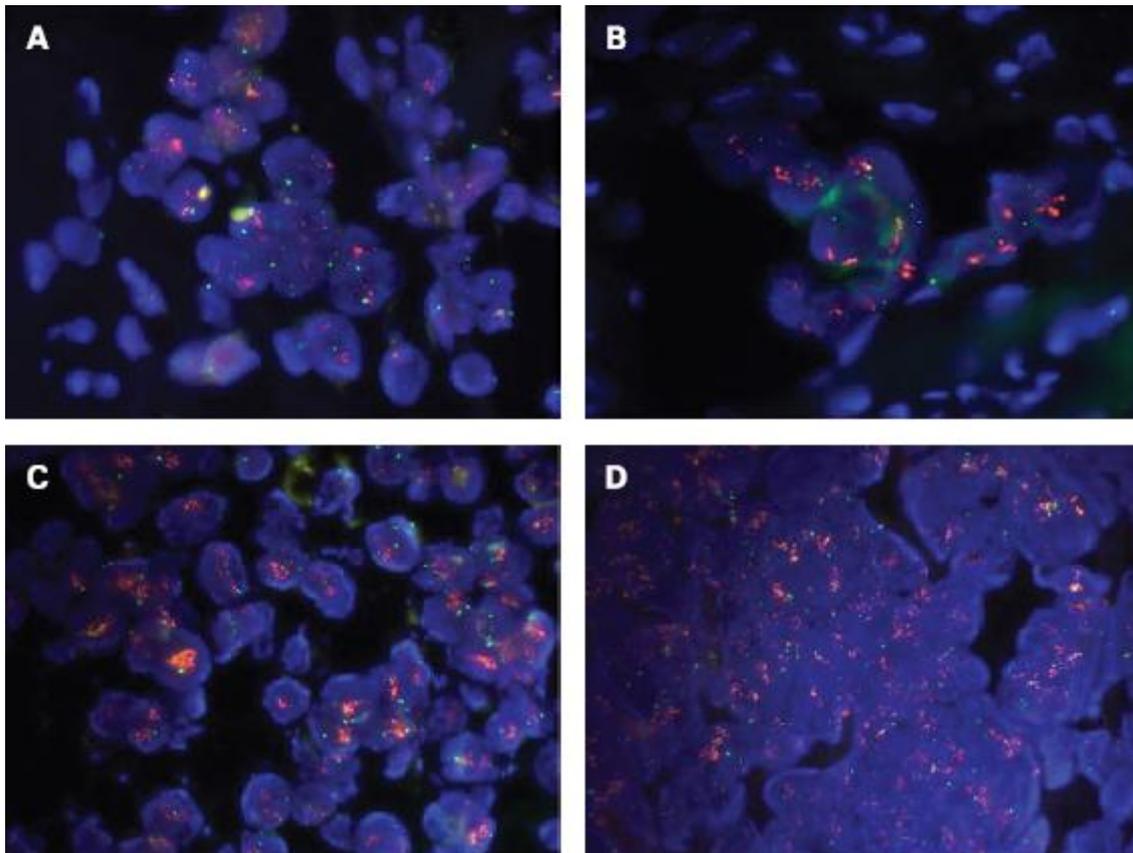
Die Evaluation der Hybridisierungsergebnisse des TMA-Schnittes erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Dabei stellten sich unter dem Mikroskop die in Tabelle 2 aufgeführten Färbungen dar.

**Tabelle 2** Darstellung der Farbsignale der Strukturen in der Untersuchung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung

<b>Struktur</b>	<b>Farbsignal</b>
HER-2/neu-Gen	orange
Chromosom 17	grün
DNA/ Zellkerne	blau

Entgegen den Empfehlungen der FISH-Probenhersteller wurden in dieser Arbeit die HER-2/neu- und Zentromer 17-Signale nicht ausgezählt, sondern die mittlere Zahl von HER-2/neu- und Zentromer 17-Signalen in Proben mit eindeutigem Amplifikationsstatus geschätzt. Frühere Studien zeigten eine sehr gute Korrelation zwischen geschätzten und durch Zählung ermittelten Signalzahlen bezüglich der HER-2/neu-Genamplifikation (Reddy et al., 2006; Sauter et al., 1996). Nur in Gewebeproben mit grenzwertigem Schätzungsergebnis erfolgte eine manuelle Auszählung von je 20 Tumorzellen einer Gewebeprobe bezüglich der HER-2/neu- und Zentromer 17-Signale.

Aus den erhobenen Werten der Schätzung und der manuellen Auszählung konnte nun das Verhältnis von HER-2/neu-Signalen zu Zentromer 17-Signalen – die HER-2-Ratio - bestimmt werden. Bei Vorliegen einer Ratio  $< 1,8$  wurde ein Tumor als nicht amplifiziert, bei eindeutigem Bestehen einer Ratio  $> 2,2$  als amplifiziert klassifiziert. Bei einer Ratio zwischen 1,8 und 2,2 war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich.



**Abbildung 14:** A-D vier unterschiedliche Spots vom Tissue Microarray mit positivem FISH-Ergebnis. Jeder Tumorzellkern zeigt 10-30 zusammengelagerte HER-2/neu-Signale (rot) sowie 2-3 Zentromer-17-Signale (grün).

#### **2.4 HER-2/neu Immunhistochemie (IHC)**

In der Immunhistochemie wird das Prinzip der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen genutzt. Dabei werden spezifische Antikörper eingesetzt, um die Verteilung von spezifischen Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen.

Dieser Arbeit liegt das Her2-Dako-Kit (Bestellnummer: K 5207; Firma: DAKO) zugrunde, um das vermehrte Vorkommen des Rezeptorproteins - das HER-2/neu- Protein - auf der Oberfläche der Zellen nachzuweisen. Die Bearbeitung in diesem Verfahren erfolgte am ungefärbten Paraffinschnitt des TMA, der auf einen Superfrost<sup>TM</sup>-Objektträger aufgezogen wurde.

Entsprechend den Vorschriften des Herstellers erfolgte die Bearbeitung des Materials in den im Folgenden beschriebenen Schritten. Zur Vorbereitung war es notwendig die Schnitte zu entparaffinieren. Dazu wurde das Material in ein Xylolbad über eine absteigende Alkoholreihe (96%ig, 80%ig, 70%ig) bis hin zu Aqua dest. verbracht. Um fixierungsbedingt verdeckte Epitope sichtbar zu machen, wurde eine HER-2-Epitopdemaskierungslösung auf das Material gebracht und für 50 Minuten in einem 95 Grad Celsius warmen Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde das Material mit DAKO-Waschpuffer gespült. Die weitere Bearbeitung erfolgte automatisch im DAKO-Autostainer mit dem Her2-DAKO-Kit.

Neben Wasch- und Spülvorgängen erfolgten der Peroxidase-Block, das Aufbringen des primären Antikörpers sowie das Aufbringen des Farbstoffes. Nach Beendigung der automatischen Vorgänge wurde der Objektträger nochmals in entionisiertem Wasser gespült. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Haemalaun (15 Sekunden). Dieses Reagenz diente der Färbung der Zellkerne. Nach fünf minütigem Wässern wurde der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, um dann mit einem Deckgläschen und Eukitt Kleber eingedeckelt zu werden.

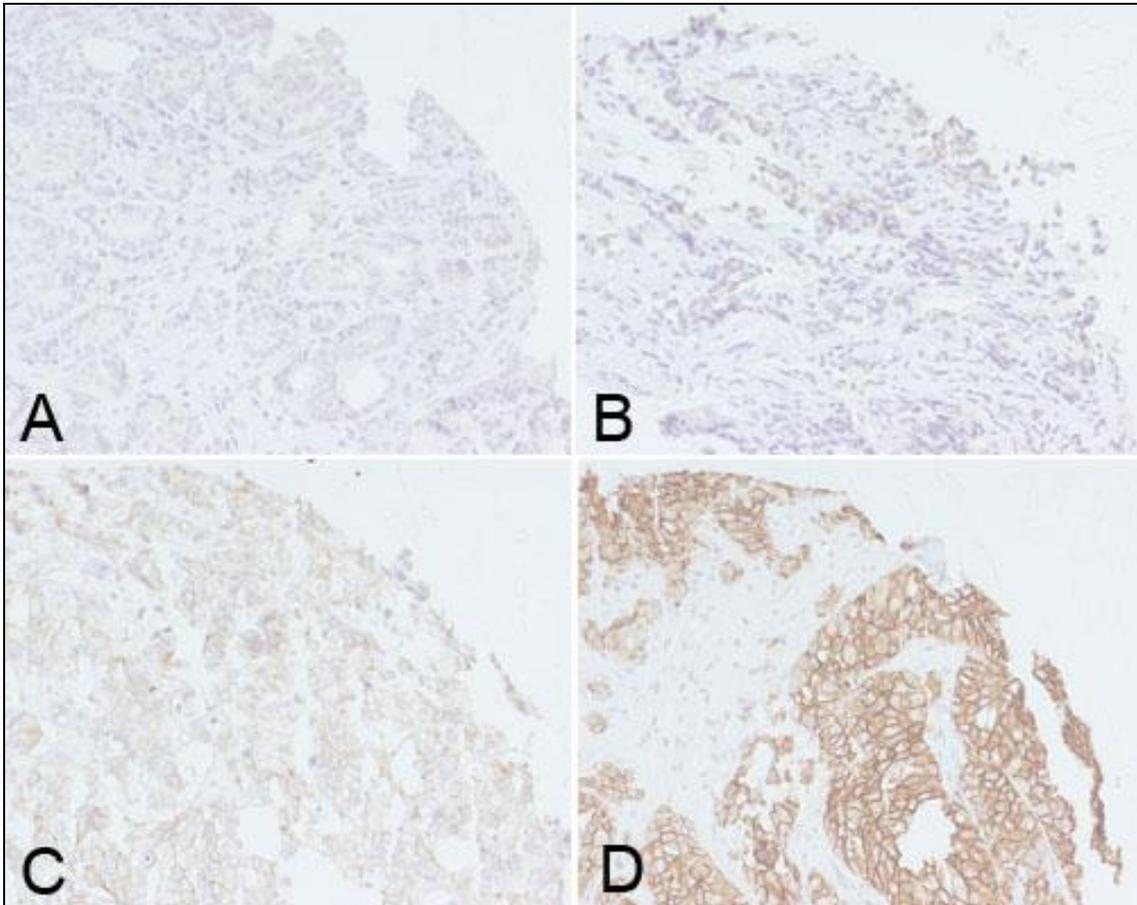
Der gefärbte Gewebearray wurde schließlich lichtmikroskopisch bei 10-facher Vergrößerung untersucht. Die Interpretation der immunhistochemischen

Befunde erfolgte gemäß den in Tabelle 3 dargestellten Vorschriften des Herstellers.

**Tabelle 3** Histologische Kriterien für die Auswertung der Immunhistochemie (IHC).

<b>HerceptTest-Score</b>	<b>Reaktionsmuster</b>	<b>Bewertung</b>
0+	Keine Färbereaktion oder <10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	negativ
1+	>10% der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	negativ
2+	>10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität gering bis mittelgradig	Schwach positiv (geringe HER-2/neu-Überexpression)
3+	>10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität stark	Stark positiv (starke HER-2/neu-Überexpression)

Gewebeproben wurden als HER-2/neu-positiv klassifiziert, wenn sie einen DAKO-Score von 2+ oder 3+ aufwiesen. Tumoren mit einem Score von 0+ oder 1+ wurden als HER-2/neu-negativ klassifiziert. Abbildung 15 zeigt immunhistochemisch gefärbte Ausschnitte aus dem Knochenmetastasen-Array.

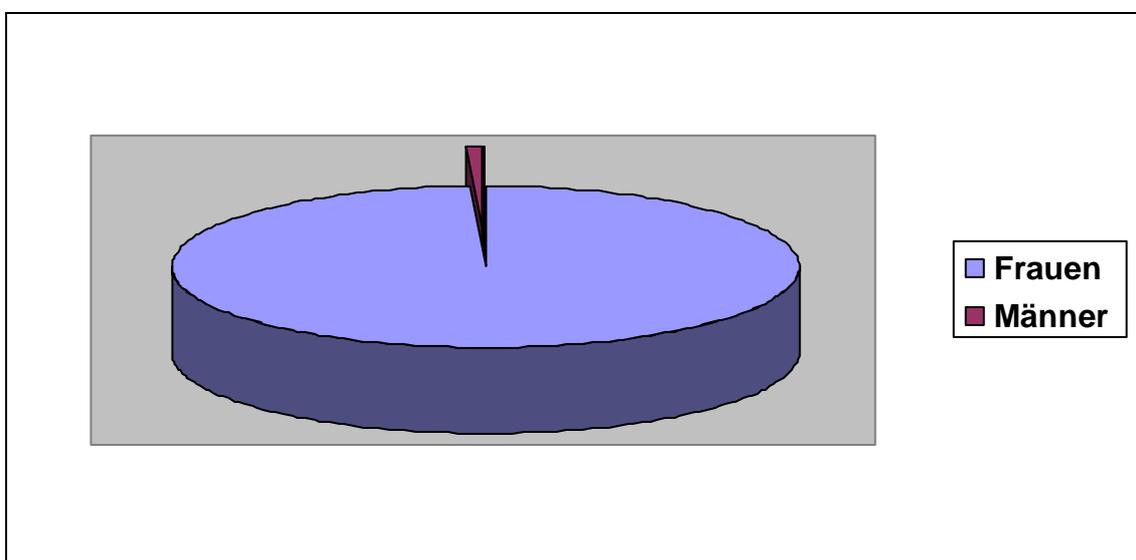


**Abbildung 15** Darstellung des immunhistologischen Reaktionsmusters an vier Einzelmetastasen  
A: IHC 0+; B: IHC 1+; C: IHC 2+; D: IHC 3+ (200fache Vergrößerung)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patientendaten

In die vorliegende Studie wurden 149 Patientinnen einbezogen, deren Tumormaterial aus diagnostizierten Knochenmetastasen in einem Zeitraum zwischen Januar 1996 bis Januar 2007 am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf untersucht worden sind. Dabei verteilte sich das Kollektiv wie in Abbildung 16 dargestellt auf 99,3% weibliche und 0,7% männliche Patienten.



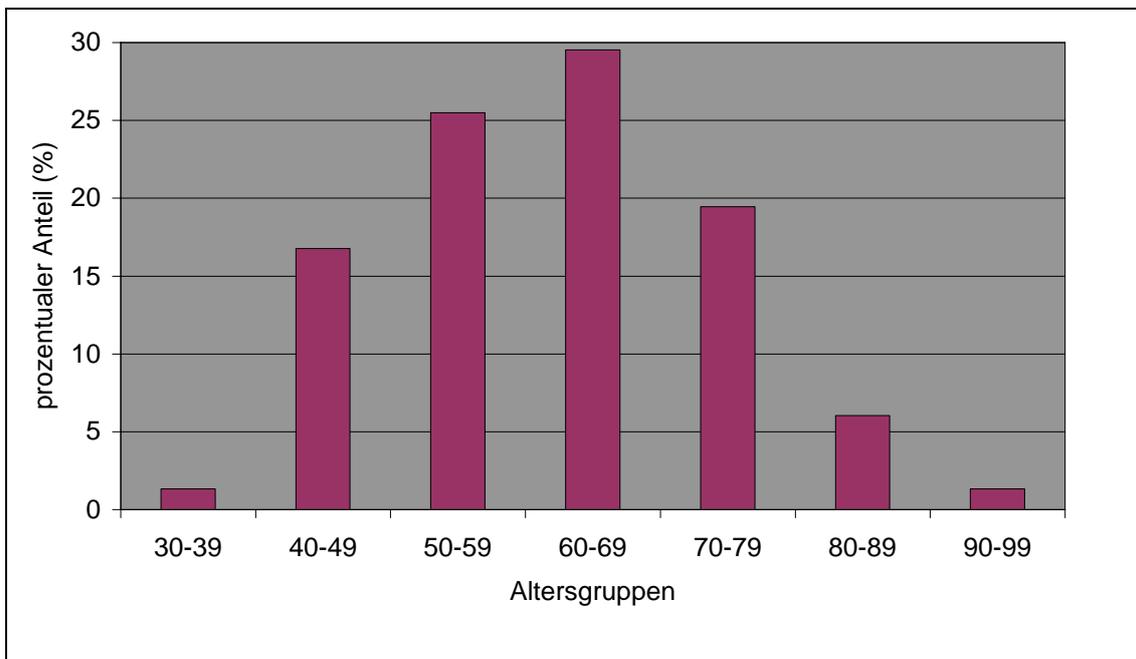
**Abbildung 16** Schematische Darstellung der Geschlechtsverteilung

Das Durchschnittsalter aller in die Studie eingeschlossenen Patientinnen betrug rund 62 Jahre. Dabei betrug das Alter der jüngsten Patientin 39 Jahre und das der ältesten 91 Jahre.

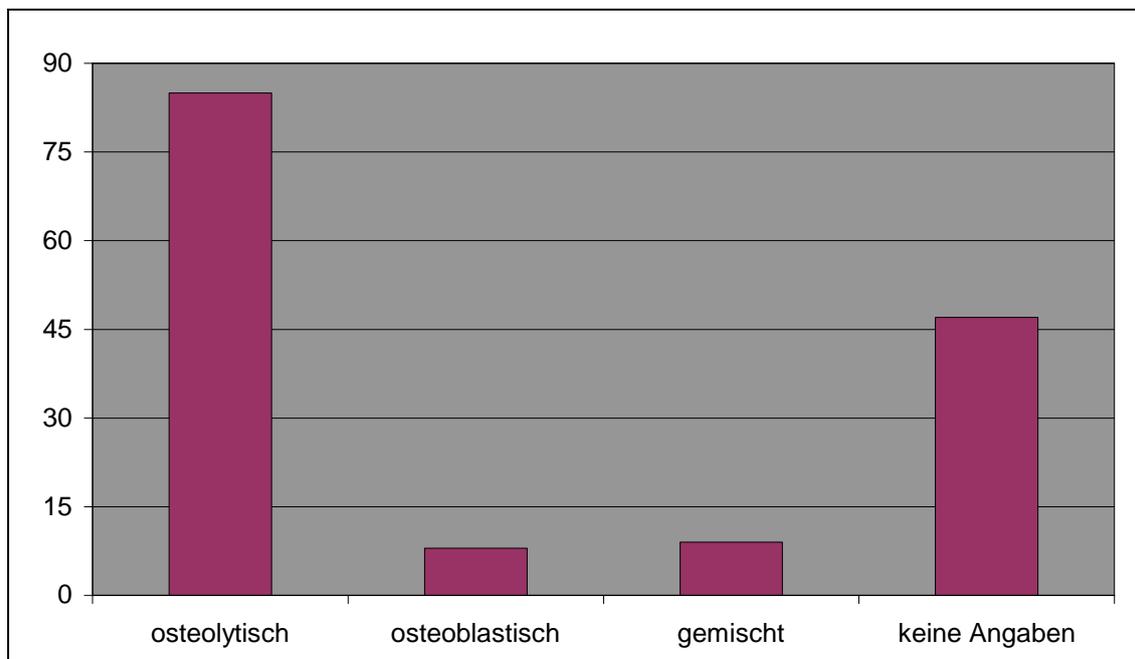
Nach Einteilung der Patientinnen in sieben Altersgruppen nahm die Gruppe der 60 bis 69 Jährigen mit 29,53% den prozentual größten Anteil ein. Mit 1,34% aller eingeschlossenen Patientinnen nahmen sowohl die Gruppe der 30 bis 39 Jährigen als auch die Gruppe zwischen 90 und 99 Jahren den prozentual geringsten Anteil ein. Die weitere Verteilung kann der Tabelle 4 und Abbildung 17 entnommen werden.

**Tabelle 4** Tabellarische Darstellung der Verteilungen der Patientenaltersgruppen mit Mammakarzinomknochenmetastasen

<b>Altersgruppe (Jahre)</b>	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99
<b>Anteil (%)</b>	1,34	16,78	25,5	29,53	19,46	6,04	1,34

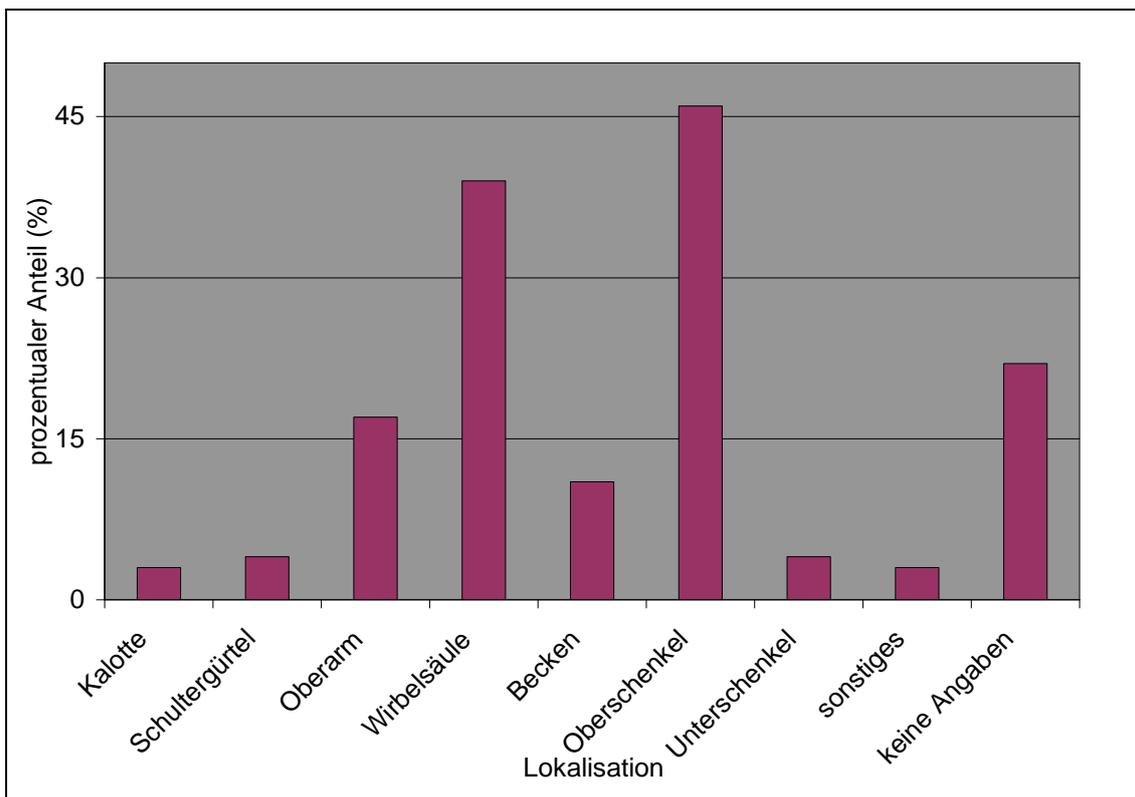
**Abbildung 17** Schematische Darstellung der Verteilung der Altersgruppen.

Anhand der Datenbankrecherche ergab sich folgende Verteilung für den klinisch-radiologischen Charakter der Knochenmetastasen (Abbildung 18). Dabei waren 85 Knochenmetastasen osteolytisch, 8 osteoblastisch, 9 zeigten einen gemischten Charakter und bei 47 gab es keine Angaben über den klinisch-radiologischen Typ.



**Abbildung 18** Schematische Darstellung der klinisch-radiologischen Typisierung der Knochenmetastasen.

Ebenso konnte aus den Befundberichten der bioptische Entnahmeort bestimmt werden. Dabei waren mit 46% der Oberschenkelknochen bzw. der Schenkelhals der häufigste Ort der Gewebeentnahme und die Schädelkalotte mit 3% der am seltensten biopsierte Entnahmeort. Die weitere Verteilung kann der Abbildung 19 entnommen werden.



**Abbildung 19** Schematische Darstellung der Verteilung der bioptischen Entnahmeorte des Gewebematerials.

### 3.2 Technische Aspekte

Auf den fortlaufenden Schnitten des Tissue Microarray, die für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie genutzt wurden, enthielten 133 der 149 untersuchten Karzinom-Spots (89,26%) Tumorgewebe.

Die übrigen 16 Proben konnten nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da ein Spot kein Gewebe enthielt und in 15 Fällen eindeutige Tumorzellen im untersuchten Material fehlten.

### 3.3 Erhobene Daten der HER-2/neu Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Der TMA wurde nur einmal hybridisiert. Von 133 Spots waren 113 auswertbar, dies entspricht einem prozentualen Anteil von 84,96%. Die übrigen 20 Gewebeproben wurden wegen zu wenig vorhandenem Tumormaterial auf dem TMA verworfen.

Der Status der Amplifikation wurde in 105 Fällen durch Schätzung und in acht Fällen durch manuelle Auszählung bestimmt. In 14 der 113 auswertbaren Spots wurde eine Amplifikation festgestellt, das entspricht 12,39%. Von diesen 14 amplifizierten Gewebeproben zeigten zwölf eine Amplifikation mit einer Ratio  $>2,2$  und zwei Gewebeproben lagen mit einer Ratio zwischen 1,8 und 2,2 im Grenzbereich. In Tabelle 5 werden die erhobenen Daten dargestellt.

**Tabelle 5** Tabellarische Darstellung der erhobenen Daten der Fluoreszenz in situ Hybridisierung

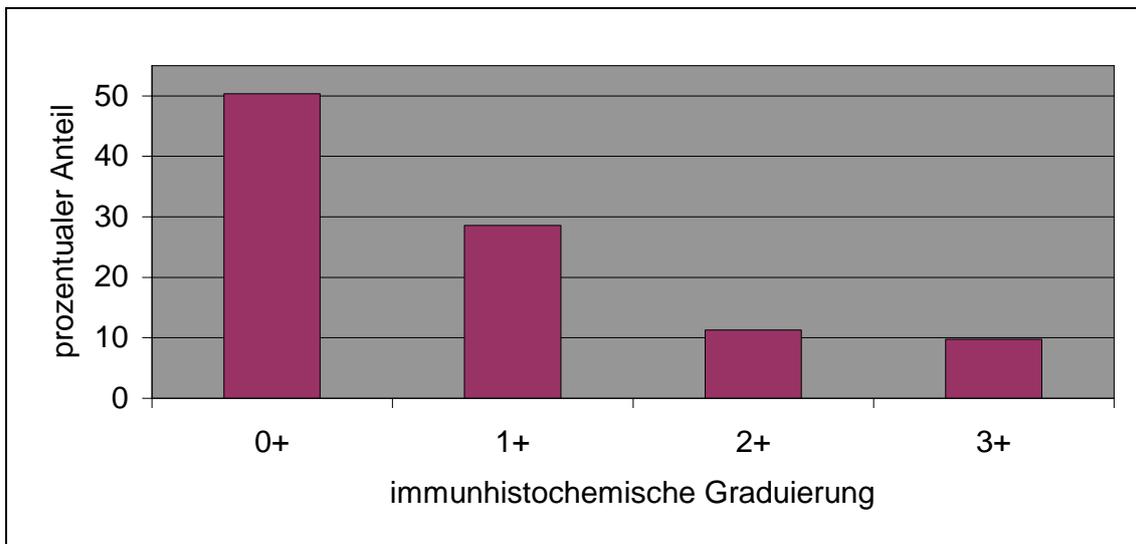
<b>Auswertung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b>	<b>N=133</b>	<b>prozentualer Anteil (%)</b>
auswertbare Spots	113	84,96
davon nicht amplifiziert (Ratio $<1,8$ )	99 von 113	87,6
davon amplifiziert (Ratio $>2,2$ )	14 von 113	12,39

### 3.4 Erhobene Daten der HER-2/neu Immunhistochemie (IHC)

In der immunhistochemischen Auswertung waren 133 von 133 Spots auswertbar. Davon waren 67 Spots immunhistochemisch 0+ (=50,36%); 38 Spots immunhistochemisch 1+ (28,57%); 15 Spots immunhistochemisch 2+ (11,28%) und 13 Spots immunhistochemisch 3+ (9,77%). Die tabellarische Darstellung erfolgt in Tabelle 6 und die grafische Darstellung in Abbildung 20.

**Tabelle 6** Tabellarische Darstellung der erhobenen Daten der immunhistochemischen Untersuchung

<b>HER-2 Immunhistochemie</b>	<b>n=133</b>	<b>prozentualer Anteil</b>
0+	67	50,36%
1+	38	28,57%
2+	15	11,28%
3+	13	9,77%



**Abbildung 20** Schematische Darstellung der immunhistologischen Auswertung.

### 3.5 Erhobene Daten der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Immunhistochemie im Vergleich

Die immunhistochemischen Ergebnisse sind in Tabelle 7 den Ergebnissen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung gegenüber gestellt.

**Tabelle 7** Vergleich der erhobenen Daten von Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie

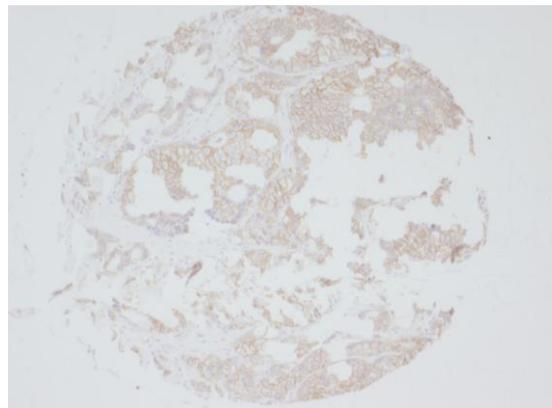
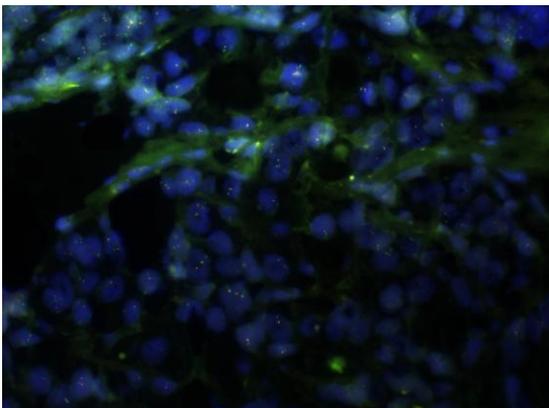
<b>HER2 Untersuchung/ n=133</b>			
<b>IHC</b>		<b>FISH</b>	
Score	Anzahl	Keine eindeutige Zuordnung (Ratio 1,8 – 2,2)	Amplifikation (Ratio > 2,2)
0+	67	1 (1,49%)	0
1+	38	1 (2,63%)	0
2+	15	0	2 (13,32%)
3+	13	0	10 (76,92%)

Nur zehn der 13 immunhistochemischen Proben mit einer Überexpression von 3+ waren in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung amplifiziert. Das entspricht einem prozentualen Anteil von 76,92%. Für die zwölf Gewebeproben mit klassischer Amplifikation in der FISH zeigte sich eine grundsätzliche Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Ergebnissen. Zwei amplifizierte Gewebeproben zeigten immunhistochemisch eine 2+ Überexpression, die übrigen zehn eine 3+ Überexpression.

Indes zeigte keine der ambivalenten Gewebeproben mit einer Ratio zwischen 1,8 und 2,2 immunhistochemisch eine 3+ Überexpression. Eine Gewebeprobe zeigte immunhistochemisch eine 1+ Überexpression und die übrigen eine 0+.

Die Proteinüberexpressionsrate in der immunhistochemischen Untersuchung lag mit insgesamt 28 Gewebeproben (15 2+ und 13 3+) im Vergleich zur FISH mit insgesamt 14 Amplifikationen etwas höher.

Ein Beispiel einer immunhistochemisch 3+ (Spot 4B) Überexpression ohne FISH Amplifikation ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 21** Spot 4B auf dem Array; links FISH – nicht amplifiziert; rechts IHC – 3+.

#### 4. Diskussion

Die Einführung von Trastuzumab (Herceptin®) in die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms führte zu einer deutlichen Verlängerung von rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit positivem HER-2/neu-Status. (Slamon et al. 2001; Vogel et al. 2002).

Voraussetzung um Trastuzumab therapeutisch einzusetzen, ist die Selektion von Mammakarzinomen mit einem positiven HER-2/neu-Status (HER-2/neu-Rezeptorüberexpression und/oder HER-2/neu-Genamplifikation), da nur Patientinnen mit diesem Tumor auf eine Behandlung mit Trastuzumab ansprechen und davon profitieren können (Baselga et al., 1999; Cobleigh et al., 1999; Slamon and Pegram, 2001; Tuma, 2005). Eine HER-2/neu-Positivität wird laut S3-Leitlinie (2012) durch eine immunhistochemisch 3+ Protein-Überexpression oder vorzugsweise durch eine mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung nachgewiesene Genamplifikation (HER2/ CEP17-Ratio > 2,2) definiert (S3-Leitlinie 2012, Carlson et al. 2006; Crump 2005; NCCN 2011; NCR1 2005; Nothacker et al. 2007; Wolff et al. 2007a). Allerdings werden gemäß den Zulassungskriterien von Trastuzumab Tumoren mit einer starken zirkulären Membranreaktion in mehr als 10% und weniger als 30% (IHC 2+) oder mit einer HER2/ CEP17-Ratio 2,0-2,2 ebenfalls als positiv gewertet. Diese Patientinnen werden in den adjuvanten Studien trotz des borderline-Status mit Trastuzumab behandelt. (Dowsett et al. 2009, Perez et al. 2010; Piccart-Gebhart et al. 2005; Romond et al. 2005). Solche zweifelhaften Ergebnisse sind sehr selten: weniger als 2% der Mammakarzinome zeigen eine HER2/ CEP 17-Ratio von 2.0 -2,2 (Sauter et al. 2009).

Aus den genannten Gründen ist es unerlässlich optimale Verfahren zur Analyse des HER-2/neu-Status sowohl am Primärtumor als auch an seinen Metastasen anzuwenden. Hierfür stehen zwei etablierte Untersuchungsmethoden, die Fluoreszenz in situ Hybridisierung und die Immunhistochemie, zur Verfügung. Der erfolgreiche Nachweis des HER-2/neu-Status an Gewebeproben des primären Mammakarzinoms ist durch beide Verfahren an in Paraffin eingebettetem und in Formalin fixiertem Gewebe in Studien dokumentiert

(Jimenez et al., 2000; Kobayashi et al., 2002; Lebeau et al., 2001; Pauletti et al., 2000; Simon et al., 2001).

Der HER-2/neu-Status wird routinemäßig an Primärtumormaterial des Mammakarzinoms untersucht. Es existieren zahlreiche Studien, die beide Untersuchungsverfahren vergleichen (Dressler et al., 2005; Ellis et al., 2005; Harris et al., 2001; Lebeau et al., 2001; Pauletti et al., 2000). Die Mehrzahl der Untersuchungen weisen eine bessere Reproduzierbarkeit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung gegenüber der Immunhistochemie auf (Dybdal et al., 2005; Jacobs et al., 1999; Makroo et al., 2012, Tubbs et al., 2001; Zhang et al., 2012). Dennoch soll eine ähnlich zuverlässige Anwendung der Immunhistochemie vor allem in Laboren mit hohem Materialeingang gelingen (Perez et al., 2006; Reddy et al., 2006).

Die Zuverlässigkeit der HER-2/neu-Status-Erhebung ist an Knochenmetastasen bisher nicht untersucht. Eine derartige Studie ist wichtig. Da es sich bei Knochengewebe typischerweise um mineralisiertes Gewebe handelt, ist es für die histologische Untersuchung unabdingbar dieses Material in der Untersuchungsvorbereitung zu demineralisieren.

In der vorliegenden Studie wurden 149 Knochenmetastasen des Mammakarzinoms bezüglich ihres HER-2/neu-Status untersucht. Dabei wurde der HER-2/neu-Status an EDTA-entkalktem Knochenmetastasengewebe des Mammakarzinoms mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie bestimmt und unter der Fragestellung nach der Anwendbarkeit beider Untersuchungsmethoden an bearbeitetem Knochengewebe analysiert. Besondere Beachtung galt dabei dem möglichen Einfluss des notwendigen Demineralisierungsschrittes während des Gewebearbeitungsprozesses auf die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung zeigte in dieser Untersuchung mit einer Häufigkeit der HER-2/neu-Genamplifikation in 12,39% der Proben ähnliche Ergebnisse wie in Publikationen unter Verwendung von Tissue Microarrays. Die

Daten dieser Studie liegen somit im Rahmen der Ergebnisse, die für Primärtumoren des Mammakarzinoms und seine nodalen Metastasen in TMA-Studien beschrieben werden (Al-Kuraya et al., 2004; Hicks and Tubbs, 2005; Simon et al., 2001). Nicht nur die erhobenen Prävalenzdaten waren plausibel, auch zeigten sich nur wenige technische Probleme.

Obwohl in dieser Untersuchung nur ein TMA-Schnitt hybridisiert wurde, ergab die HER-2/neu-FISH-Untersuchung auswertbare Ergebnisse bei 113 von 133 untersuchten Proben und somit einen Untersuchungserfolg von 84,96%. Während die Erfolgsrate bei anderen TMA-FISH-Untersuchungen von Primärtumoren des Mammakarzinoms im selben Labor unter Verwendung identischer Reagenzien nur bei 77% lag. (Simon et al., 2001).

Bei den Gewebeproben ohne Ergebnis in der FISH ist es möglich, dass in Großflächenuntersuchungen derselben Proben ein Ergebnis erhoben werden könnte. Auf einem TMA befindet sich nur ein kleiner Teil des Gesamttumors, welcher während der Gewebearbeitung beschädigt werden kann. Grundsätzlich ist auch davon auszugehen, dass individuelle Anpassung der Hybridisierungsschritte und der Proteasevorbehandlung die Erfolgsrate positiv beeinflussen würde.

Es ist hervorzuheben, dass der Entkalkungsschritt am Pathologischen Institut des Universitätsklinikum Eppendorf hoch standardisiert durchgeführt wurde. Durch tägliches Röntgen der Gewebeproben wurde der Demineralisierungsprozess kontrolliert, um die Einflüsse auf alle sekundären Untersuchungsmethoden so gering wie möglich zu halten. Unter diesen standardisierten Untersuchungsbedingungen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ebenso gut an EDTA-entkalktem Knochenmaterial wie an unentkalkten bearbeiteten Gewebeproben des Primärtumors anwendbar ist.

Bei einem Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden – Fluoreszenz in situ Hybridisierung und Immunhistochemie – zeigte sich eine Übereinstimmung der Amplifikation in Gewebeproben mit immunhistochemisch 3+ von 76,92%. Dies

liegt im Bereich der bisher publizierten Literatur. In einer Studie (BCIR6 005/006) mit mehr als 2000 nachuntersuchten 3+ Tumoren waren 78,2% der Proben in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung amplifiziert (Press et al., 2005).

Die immunhistochemische Untersuchung ergab eine höhere Rate an positiven Fällen als die Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Dies erstaunt nicht.

Es ist bekannt, dass die Immunhistochemie wesentlich durch die vorhergehenden Gewebeparbeitungsschritte beeinflusst werden kann. Diese Problematik ist bereits in verschiedenen Publikationen über die HER-2/neu-Testung an in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des primären Mammakarzinoms dokumentiert. Dort werden positive Ergebnisse zwischen 2% und mehr als 50% beschrieben (Andersson et al., 2002; Jacobs et al., 1999; Press et al., 1994; Revillion et al., 1998). Generell sollten standardisierte Tests mit Kontrollzelllinien dieses Problem beseitigen. Dennoch wurde schnell klar, dass auch das entwickelte vorgefertigte „KIT“ nicht vor Fehlern schützt. Positive Untersuchungsergebnisse zwischen 30% und 50% traten trotz Anwendung des FDA-erprobten HerceptTest auf (DAKO) (Jacobs et al., 1999; Lebeau et al., 2001; Roche and Ingle, 1999). So wurde deutlich, dass eine ungewöhnliche Fixierung der Gewebeproben zu falsch positiven HER-2/neu immunhistochemischen Ergebnissen führen kann (Hammond et al., 2003; Penault-Llorca et al., 1994; Wolff et al., 2007). Um diese falsch-positiven Ergebnisse während der Fixierung zu kompensieren, wurde ein modifiziertes Beurteilungssystem empfohlen, bei der die Färbung von gesundem Brustgewebe berücksichtigt wird (Hanna, 2001; Jacobs et al., 1999; Yaziji et al., 2004). Allerdings ist dies bei der HER-2/neu-Analyse von Metastasen nicht möglich, weil das Knochengewebe keine benignen bzw. physiologischen epithelialen Gewebe enthält.

Ebenfalls sind falsch-negative IHC-Ergebnisse dokumentiert – diese variieren von Antikörper zu Antikörper (Press et al., 1994).

In einer Studie am Institut für Pathologie Basel wurde in 15,6% der untersuchten Mammakarzinome eine HER-2/neu-Positivität (2+/3+) gefunden,

welche in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung interpretierbar waren. Im Gegensatz dazu fand sich eine immunhistochemische HER-2/neu-Positivität nur in 7,6% der untersuchten Proben, welche in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung nicht interpretierbar waren (Tapia et al., 2004). Die plausibelste Erklärung hierfür ist, dass „uncharakteristische Gewebeerstörung“ beides beeinflusst – zum einen die Interpretierbarkeit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und das Funktionieren der immunhistochemischen Untersuchung. Der markante Vorteil der FISH-Methode liegt darin, dass hier – im Gegensatz zur Immunhistochemie – das Problem immer erkannt wird.

Im Übrigen kann auch die Verwendung von nicht frisch geschnittenen Gewebeproben Einfluss auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung nehmen (Mirlacher et al., 2004). Dies zeigt weiter, wie unzuverlässig die Immunhistochemie sein kann.

Nicht alle Proben mit negativen Ergebnissen in der immunhistochemischen Untersuchung und positiven Untersuchungsergebnissen in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung sind auch falsch negative immunhistochemische Gewebeproben. Alle in der vorliegenden Studie immunhistochemisch negativen, aber FISH positiven Metastasen zeigten grenzwertige Ergebnisse mit einer Ratio zwischen 1,8 und 2,2 und einer mittleren HER-2/neu-Kopienanzahl zwischen 3,1 und 5,0. Es ist unwahrscheinlich, dass Karzinome mit solch einer niedrigen Amplifikationsrate in der Lage wären HER-2/neu auf dem Niveau von klassisch amplifizierten Karzinomen mit einer Kopienanzahl von 20 bis 50 HER-2/neu-Genkopien zu exprimieren. Die klinische Relevanz solcher Grenzbefunde in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist unbekannt, da bisher keine Studien existieren, welche die Wirksamkeit von Trastuzumab bei Anwendung an niedrig amplifizierten Mammakarzinomen untersucht haben. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass beide Untersuchungsverfahren - sowohl die Fluoreszenz in situ Hybridisierung als auch die Immunhistochemie - an EDTA-entkalktem Knochengewebe anwendbar sind. Die Erfolgsrate und die Übereinstimmung beider Methoden sind vergleichbar mit ihren Anwendungen an nichtkalkifizierten in Formalin fixierten Gewebeproben des primären Mammakarzinoms.

Die Erfolgsrate von Fluoreszenz in situ Hybridisierung an standardisiert und sorgfältig entkalkten Knochenmetastasen des Mammakarzinoms ist sehr hoch. Die Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Immunhistochemie weist daraufhin, dass die Immunhistochemie bei Anwendung eines standardisierten Demineralisierungsschrittes mit regelmäßiger röntgenologischer Kontrolle zur Vermeidung einer Überentkalkung und Schädigung des Gewebes zuverlässig ist.

Aufgrund der Variabilität bei der Gewebeparbeitung zur immunhistochemischen Untersuchung des HER2/neu-Status sowie der Schwierigkeiten bei der Umsetzung des vollständig standardisierten Demineralisierungsvorganges im Laboralltag ist die Fluoreszenz in situ Hybridisierung der Immunhistochemie zur Untersuchung des HER-2/neu-Status an Knochenmetastasen vorzuziehen.

## 7. Zusammenfassung

Der HER-2/neu-Rezeptor ist ein wichtiger Ansatzpunkt der erfolgreichen antikörperbasierten Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. Die Analyse des HER-2/neu-Status erfolgt mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung oder mittels Immunhistochemie. Ziel dieser Studie war die Untersuchung des HER-2/neu-Status an EDTA-entkalkten Mammakarzinomknochenmetastasen unter der Fragestellung nach der Anwendbarkeit an Knochengewebe und ob der notwendige Demineralisierungsprozess mittels EDTA-Entkalkung der Knochenmetastasen Einfluss auf die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden nimmt. Hierfür wurde ein Tissue Microarray von 149 Mammakarzinomknochenmetastasen konstruiert. Die angefertigten Schnitte wurden mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (PathVysion™; Vysis-Abbott) und Immunhistochemie (HerceptTest™, DAKO) untersucht. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung zeigte in 113 Fällen des Gesamtmaterials ein auswertbares Ergebnis (84,96%). Dabei wurde eine Amplifikation bei 14 Knochenmetastasen (12,39%) festgestellt. Die positiven Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung des Rezeptorstatus waren ein wenig höher. Eine 3+ wurde in 9,77% und eine 2+ wurde in 11,28% der auswertbaren Gewebeproben gesehen. Der Vergleich beider Untersuchungsmethoden zeigte eine hohe Übereinstimmung. Von den 14 amplifizierten Proben wiesen zehn (76,92%) 3+, zwei (13,3%) 2+, einer (2,63%) 1+ und einer (1,49%) 0+ immunhistochemische Ergebnisse auf. Drei von vier amplifizierten Gewebeproben ohne 3+ zeigten grenzwertige Fluoreszenz in situ Hybridisierungs-Ergebnisse mit einer HER-2/neu zu Zentromer 17 Ratio zwischen 1,8 und 2,2. Bei den 13 immunhistochemisch 3+ Ergebnissen zeigte sich eine Amplifikation in 10 Fällen (76,92%). Die hohe Erfolgsrate der Fluoreszenz in situ Hybridisierung an standardisiert und sorgfältig entkalkten Mammakarzinomknochenmetastasen deutet auf eine sichere Anwendbarkeit bei deren Untersuchung hin. Die hohe Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Immunhistochemie spricht dafür, dass die Immunhistochemie gleichermaßen an EDTA-entkalktem Knochenmaterial wie an in Formalin fixiertem nichtossärem Gewebematerial angewandt werden kann. Der notwendige Demineralisierungsschritt nimmt bei sorgfältiger Durchführung keinen substantiellen zusätzlichen negativen Einfluss auf die Ergebnisse der FISH und IHC. Aufgrund der aufwendigen Gewebeparbeitungsschritte und der Variabilität während des Bearbeitungsprozesses ist die FISH der IHC vorzuziehen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., and Yamamoto, T., 1986, The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity: *Science*, v. 232, p. 1644-6.
- Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross, F., Wilber, K., Simon, R., and Sauter, G., 2004, Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer: *Cancer Res*, v. 64, p. 8534-40.
- Alroy, I., and Yarden, Y., 1997, The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions: *FEBS Lett*, v. 410, p. 83-6.
- Andersson, J., Linderholm, B., Greim, G., Lindh, B., Lindman, H., Tennvall, J., Tennvall-Nittby, L., Pettersson-Skold, D., Sverrisdottir, A., Soderberg, M., Klaar, S., and Bergh, J., 2002, A population-based study on the first forty-eight breast cancer patients receiving trastuzumab (Herceptin) on a named patient basis in Sweden: *Acta Oncol*, v. 41, p. 276-81.
- ASCO clinical notice. HER2 clinical notice. <http://www.asco.org/guidelines/her2>. 05.11.2013, 16:37Uhr.
- Bartlett, J.M., Going, J.J., Mallon, E.A., Watters, A.D., Reeves, J.R., Stanton, P., Richmond, J., Donald, B., Ferrier, R., and Cooke, T.G., 2001, Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer: *J Pathol*, v. 195, p. 422-8.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C.C., Dantis, L., Sklarin, N.T., Seidman, A.D., Hudis, C.A., Moore, J., Rosen, P.P., Twaddell, T., Henderson, I.C., and Norton, L., 1999, Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer: *Semin Oncol*, v. 26, p. 78-83.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., and Carpenter, G., 1996, All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired: *J Biol Chem*, v. 271, p. 5251-7.
- Bender, H.G., Schnürch, H.-G. Diagnostik und Therapie von malignen Tumoren und deren Vorstadien an der Mamma. Bender, H.G. (Hrsg.): *Gynäkologische Onkologie*, 347-375, Thieme, Stuttgart, New York 1991)

- Bieche, I., and Lidereau, R., 1995, Genetic alterations in breast cancer: Genes Chromosomes Cancer, v. 14, p. 227-51.
- Bundred, N.J. Prognostic and predictive factors in breast cancer. Cancer Treat Rev 2001; 27(3):137-142.
- Carlson, R.W., Moench, S.J., Hammond, M.E., Perez, E.A., Burstein, H.J., Allred, D.C., Vogel, C.L., Goldstein, L.J., Somlo, G., Gradishar, W.J., Hudis, C.A., Jahanzeb, M., Stark, A., Wolff, A.C., Press, M.F., Winer, E.P., Paik, S., Ljung, B.M. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. J Natl Compr Canc Netw 2006; 4 Suppl 3:S1-22.
- Carpenter, G., 1987, Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens: Annu Rev Biochem, v. 56, p. 881-914.
- Carraway, K.L., 3rd, Sliwkowski, M.X., Akita, R., Platko, J.V., Guy, P.M., Nuijens, A., Diamonti, A.J., Vandlen, R.L., Cantley, L.C., and Cerione, R.A., 1994, The erbB3 gene product is a receptor for heregulin: J Biol Chem, v. 269, p. 14303-6.
- Carter, C.L., Allen, C., Henson, D.E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63(1):181-187.
- Christopher D.M. Fletcher, K.K.U., Fredrik Mertens, 2002, Pathology & Genetics Tumors of Soft Tissue and Bone, IARC Press.
- Ciampa, A., Xu, B., Ayata, G., Baiyee, D., Wallace, J., Wertheimer, M., Edmiston, K., and Khan, A., 2006, HER-2 status in breast cancer: correlation of gene amplification by FISH with immunohistochemistry expression using advanced cellular imaging system: Appl Immunohistochem Mol Morphol, v. 14, p. 132-7.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., and Slamon, D.J., 1999, 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, v. 17, p. 2639-48.
- Coleman, R.E., 2001, Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies: Cancer Treat Rev, v. 27, p. 165-76.

- Colleoni, M., Rotmensz, N., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Pruneri, G., Casadio, C., Luini, A., Veronesi, P., Intra, M., Galimberti, V., Torrì, R., Andrighetto, S., Ghisini, R., Goldhirsch, A., Viale, G. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18(10):1632-1640.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., and et al., 1985, Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene: *Science*, v. 230, p. 1132-9.
- Crump, M. The role of trastuzumab (Herceptin) in the treatment of women with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer. Practice Guideline Report #1-15 Version 2.2004. 2005.
- De Potter, C.R., Beghin, C., Makar, A.P., Vandekerckhove, D., and Roels, H.J., 1990, The neu-oncogene protein as a predictive factor for haematogenous metastases in breast cancer patients: *Int J Cancer*, v. 45, p. 55-8.
- Devilee, P., and Cornelisse, C.J., 1994, Somatic genetic changes in human breast cancer: *Biochim Biophys Acta*, v. 1198, p. 113-30.
- Dougall, W.C., Qian, X., Peterson, N.C., Miller, M.J., Samanta, A., and Greene, M.I., 1994, The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies: *Oncogene*, v. 9, p. 2109-23.
- Dowsett, M., Bartlett, J., Ellis, I.O., Salter, J., Hills, M., Mallon, E., Watters, A.D., Cooke, T., Paish, C., Wencyk, P.M., and Pinder, S.E., 2003, Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres: *J Pathol*, v. 199, p. 418-23.
- Dowsett, M., Procter, M., McCaskill-Stevens, W., de Azambuja, E., Dafni, U., Rueschoff, J., Jordan, B., Dolci, S., Abramovitz, M., Stoss, O., Viale, G., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Leyland-Jones, B. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27(18):2962-2969.

- Dressler, L.G., Berry, D.A., Broadwater, G., Cowan, D., Cox, K., Griffin, S., Miller, A., Tse, J., Novotny, D., Persons, D.L., Barcos, M., Henderson, I.C., Liu, E.T., Thor, A., Budman, D., Muss, H., Norton, L., and Hayes, D.F., 2005, Comparison of HER2 status by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry to predict benefit from dose escalation of adjuvant doxorubicin-based therapy in node-positive breast cancer patients: *J Clin Oncol*, v. 23, p. 4287-97.
- Dybdal, N., Leiberman, G., Anderson, S., McCune, B., Bajamonde, A., Cohen, R.L., Mass, R.D., Sanders, C., and Press, M.F., 2005, 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*, v. 93, p. 3-11.
- EBCTCG. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1992; 339(8785):71-85.
- EBCTCG. Ovarian ablation for early breast cancer. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000485.
- Ellis, C.M., Dyson, M.J., Stephenson, T.J., and Maltby, E.L., 2005, HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques: *J Clin Pathol*, v. 58, p. 710-4.
- Elston, C.W., Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-410.
- Ferlay J BF, S.R., Parkin D. (2004), 2004, Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide: *Globocan*, v. 2.0.
- Fisher, E.R., Redmond, C., Fisher, B., Bass, G. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 1990; 65(9 Suppl):2121-2128.

- Gasparini, G., Weidner, N., Bevilacqua, P., Maluta, S., Dalla Palma, P., Caffo, O., Barbareschi, M., Boracchi, P., Marubini, E., Pozza, F. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12(3):454-466.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., and Hynes, N.E., 1995, Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling: *Mol Cell Biol*, v. 15, p. 1182-91.
- Grushko, T.A., Blackwood, M.A., Schumm, P.L., Hagos, F.G., Adeyanju, M.O., Feldman, M.D., Sanders, M.O., Weber, B.L., and Olopade, O.I., 2002, Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers: *Cancer Res*, v. 62, p. 1481-8.
- Hammond, M.E., Barker, P., Taube, S., and Gutman, S., 2003, Standard reference material for Her2 testing: report of a National Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop: *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v. 11, p. 103-6.
- Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C., Taube, S., Torlakovic, E.E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C., 2010 American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*; 28(16):2784-2795.
- Hanna, W., 2001, Testing for HER2 status: *Oncology*, v. 61 Suppl 2, p. 22-30.
- Harris, L.N., Liotcheva, V., Broadwater, G., Ramirez, M.J., Maimonis, P., Anderson, S., Everett, T., Harpole, D., Moore, M.B., Berry, D.A., Rizzeri, D., Vredenburgh, J.J., and Bentley, R.C., 2001, Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy: *J Clin Oncol*, v. 19, p. 1698-706.

- Hicks, D.G., and Tubbs, R.R., 2005, Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines: *Hum Pathol*, v. 36, p. 250-61.
- Hirashima, N., Takahashi, W., Yoshii, S., Yamane, T., and Ooi, A., 2001, Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study: *Mod Pathol*, v. 14, p. 556-62.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Orrico, A.R., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullis, M., Quackenbush, John.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernhard, P.S., Perou, C.M., 2006, The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7:96
- Hynes, N.E., and Stern, D.F., 1994, The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer: *Biochim Biophys Acta*, v. 1198, p. 165-84.
- Jacobs, T.W., Gown, A.M., Yaziji, H., Barnes, M.J., and Schnitt, S.J., 1999, Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system: *J Clin Oncol*, v. 17, p. 1983-7.
- Jaquemier, J., Charpin, C., 1998 Reproducibility of histoprognostic grades of invasive breast cancer. *Ann Pathol* 18:385-390
- Jimenez, R.E., Wallis, T., Tabaszka, P., and Visscher, D.W., 2000, Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization: *Mod Pathol*, v. 13, p. 37-45.
- Kato, T., Kameoka, S., Kimura, T., Nishikawa, T., Kobayashi, M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88(12):1900-1908.
- Kern, J.A., Schwartz, D.A., Nordberg, J.E., Weiner, D.B., Greene, M.I., Torney, L., and Robinson, R.A., 1990, p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival: *Cancer Res*, v. 50, p. 5184-7.

- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M., and Yarden, Y., 1999, The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 4995-5000.
- Klapper, L.N., Kirschbaum, M.H., Sela, M., and Yarden, Y., 2000, Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors: *Adv Cancer Res*, v. 77, p. 25-79.
- Knörr, K., Knörr-Gärtner, H., Beller, F.K., Lauritzen, C., 1989, *Geburtshilfe und Gynäkologie, Physiologie und Pathologie der Reproduktion*. 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kobayashi, M., Ooi, A., Oda, Y., and Nakanishi, I., 2002, Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in breast carcinomas: a comparative study of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: *Hum Pathol*, v. 33, p. 21-8.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallioniemi, O.P., 1998, Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens: *Nat Med*, v. 4, p. 844-7.
- Kreienberg, R., Volm, T., Möbius, V., Alt, D., 2002 *Management des Mammakarzinoms*, 2. Auflage, Seite 258–259 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2002.
- Kurtz, J.M., Amalric, R., Brandone, H., Ayme, Y., Jacquemier, J., Pietra, J.C., Hans, D., Pollet, J.F., Bressac, C., Spitalier, J.M. Local recurrence after breast-conserving surgery and radiotherapy. Frequency, time course, and prognosis. *Cancer* 1989; 63(10):1912-1917.
- Lebeau, A., Deimling, D., Kaltz, C., Sendelhofert, A., Iff, A., Luthardt, B., Untch, M., and Lohrs, U., 2001, Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: *J Clin Oncol*, v. 19, p. 354-63.
- Lupu, R., Cardillo, M., Harris, L., Hijazi, M., and Rosenberg, K., 1995, Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance: *Semin Cancer Biol*, v. 6, p. 135-45.

- M. Untch, H.S., I. Bauerfeind, M. Reiser, H. Hepp, 2004, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms: München, W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York.
- Mass, R.D., Press, M.F., Anderson, S., Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Dybdal, N., Leiberman, G., and Slamon, D.J., 2005, Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab: Clin Breast Cancer, v. 6, p. 240-6.
- Makroo, R.N., Chowdhry, M., Kumar, M., Srivastava, P., Tyagi, R., Bhadauria, P., Kaul, S., Sarin, R., Das, P.K., Dua, H., 2012, Correlation between HER2 gene amplification and protein overexpression through fluorescence in situ hybridization an immunohistochemistry in breast carcinoma patients. Indian J Pathol Microbiol. 2012 Oct;55(4):481-4.
- Mirlacher, M., Kasper, M., Storz, M., Knecht, Y., Durmuller, U., Simon, R., Mihatsch, M.J., and Sauter, G., 2004, Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry: Mod Pathol, v. 17, p. 1414-20.
- NCCN. National Comprehensive Cancer Network. Breast cancer. V. 2.2011. 2011.
- NCRI. UK Clinical Guidelines for the use of adjuvant Trastuzumab (HerceptinR) with or following chemotherapy in HER2-positive Early breast Cancer. 2005.
- NICE. National Institute for Clinical Excellence (NICE): Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and treatment. 2009.
- Nothacker, M., Lelgemann, M., Giersiepen, K., and Weinbrenner, S. Evidenzbericht 2007 zur S3-Leitlinie Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland. 2007.
- NZGG. New Zealand Guidelines Group: Management of early breast cancer. Wellington: 2009.
- Osborne, C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. Breast Cancer Res Treat 1998; 51(3):227-238.
- Page, D.L., Jensen, R.A., Simpson, J.F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1998; 51(3):195-208.

- Page, D.L., Rogers, L.W. Combined histologic and cytologic criteria for the diagnosis of mammary atypical ductal hyperplasia. *Hum Pathol* 1992; 23(10):1095-1097.
- Park, C.C., Mitsumori, M., Nixon, A., Recht, A., Connolly, J., Gelman, R., Silver, B., Hetelekidis, S., Abner, A., Harris, J.R., Schnitt, S.J., Outcome at 8 years after breast-conserving surgery and radiation therapy for invasive breast cancer: influence of margin status and systemic therapy on local recurrence. *J Clin Oncol* 2000; 18(8):1668-1675.
- Pauletti, G., Dandekar, S., Rong, H., Ramos, L., Peng, H., Seshadri, R., and Slamon, D.J., 2000, 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*, v. 18, p. 3651-64.
- Penault-Llorca, F., Adelaide, J., Houvenaeghel, G., Hassoun, J., Birnbaum, D., and Jacquemier, J., 1994, Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation: *J Pathol*, v. 173, p. 65-75.
- Perez, E.A., Suman, V.J., Davidson, N.E., Martino, S., Kaufman, P.A., Lingle, W.L., Flynn, P.J., Ingle, J.N., Visscher, D., and Jenkins, R.B., 2006, HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial: *J Clin Oncol*, v. 24, p. 3032-8.
- Perez, E A., Reinholz, M.M., Hillman, D.W., Tenner, K.S., Schroeder, M.J., Davidson, N.E., Martino, S., Sledge, G.W., Harris, L.N., Gralow, J.R., Dueck, A.C., Ketterling, R.P., Ingle, J.N., Lingle, W.L., Kaufman, P.A., Visscher, D.W., Jenkins, R.B. 2010 HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol*; 28(28):4307-4315.

- Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C.H., Steger, G., Huang, C.S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T.M., Ruschoff, J., Suto, T., Grotzer, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M.S., Gelber, R.D. 2005 Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*; 353(16):1659-1672.
- Plosker, G.L., and Keam, S.J., 2006, Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer: *Drugs*, v. 66, p. 449-75.
- Popescu, N.C., King, C.R., and Kraus, M.H., 1989, Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32: *Genomics*, v. 4, p. 362-6.
- Press, M.F., Hung, G., Godolphin, W., and Slamon, D.J., 1994, Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression: *Cancer Res*, v. 54, p. 2771-7.
- Press, M.F., Sauter, G., Bernstein, L., Villalobos, I.E., Mirlacher, M., Zhou, J.Y., Wardeh, R., Li, Y.T., Guzman, R., Ma, Y., Sullivan-Halley, J., Santiago, A., Park, J.M., Riva, A., and Slamon, D.J., 2005, 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*, v. 11, p. 6598-607.
- Rajkumar, T., and Gullick, W.J., 1994, The type I growth factor receptors in human breast cancer: *Breast Cancer Res Treat*, v. 29, p. 3-9.
- Reddy, J.C., Reimann, J.D., Anderson, S.M., and Klein, P.M., 2006, Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study: *Clin Breast Cancer*, v. 7, p. 153-7.
- Revillion, F., Bonnetterre, J., and Peyrat, J.P., 1998, ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance: *Eur J Cancer*, v. 34, p. 791-808.
- Riede, U.N., Schaefer, H.E: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York 1993

- Robbins, P, Pinder, S, de Klerk, N et al (1995) Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Human Pathol* 26: 873-879.
- Robert-Koch-Institut, 2012, Krebs in Deutschland 2007/ 2008 Häufigkeiten und Trends, Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., in 8. Ausgabe, ed., Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Saarbrücken.
- Roche, P.C., and Ingle, J.N., 1999, Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody: *J Clin Oncol*, v. 17, p. 434.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N., Wolmark, N. 2005 Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*; 353(16):1673-1684.
- Rosen, P.P., Groshen, S., Kinne, D.W. 1991 Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* 1991; 9(9):1650-1661.
- Rosen, P.P., Groshen, S., Kinne, D.W., Norton, L. 1993 Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11(11):2090-2100.
- Rubin, I., and Yarden, Y., 2001, The basic biology of HER2: *Ann Oncol*, v. 12 Suppl 1, p. S3-8.
- S3-Leitlinie 2012, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V. (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms S. 92-118
- Sauter, G., Feichter, G., Torhorst, J., Moch, H., Novotna, H., Wagner, U., Durmuller, U., and Waldman, F.M., 1996, Fluorescence in situ hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies: *Acta Cytol*, v. 40, p. 164-73.

- Sauter, G., Lee, J., Bartlett, J.M., Slamon, D.J., Press, M.F. 2009 Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*; 27(8):1323-1333.
- Schaller, G., 2002, Antikörpertherapie des Mammakarzinoms: Bremen, Uni Med. Verlag, 77 p.
- Schmidt, M., Lewark, B., Kohlschmidt, N., Glawatz, C., Steiner, E., Tanner, B., Pilch, H., Weikel, W., Kolbl, H., and Lehr, H.A., 2005, Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing: *Breast Cancer Res*, v. 7, p. R256-66.
- Smith, I, Procter, M, Gelber, RD, Guillaume, S, Feyereislova, A, Dowsett, M et al. 2007 2-Year follow-up of trastuzumab after adjuvant Chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* January 6;369(9555):29-36).
- Seshadri, R., Firgaira, F.A., Horsfall, D.J., McCaul, K., Setlur, V., and Kitchen, P., 1993, Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group: *J Clin Oncol*, v. 11, p. 1936-42.
- Simon, R., Nocito, A., Hubscher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Mihatsch, M.M., Moch, H., Wilber, K., Schotzau, A., Kononen, J., and Sauter, G., 2001, Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer: *J Natl Cancer Inst*, v. 93, p. 1141-6.
- Slamon, D., and Pegram, M., 2001, Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials: *Semin Oncol*, v. 28, p. 13-9.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L., 1987, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene: *Science*, v. 235, p. 177-82.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L., 2001, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2: *N Engl J Med*, v. 344, p. 783-92.

- Stefano, R., Agostara, B., Calabro, M., Campasi, I., Ravazzolo, B., Traina, A., Miele, M., Castagnetta, L. 2004, Expression levels and clinical-pathological correlations of HER2/neu in primary and metastatic human breast cancer: *Ann NY Acad Sci* 1028:463-472.
- Tapia, C., Schraml, P., Simon, R., Al-Kuraya, K.S., Maurer, R., Mirlacher, M., Novotny, H., Spichtin, H., Mihatsch, M.J., and Sauter, G., 2004, HER2 analysis in breast cancer: reduced immunoreactivity in FISH non-informative cancer biopsies: *Int J Oncol*, v. 25, p. 1551-7.
- Todorovic-Rakovic, N., Jovanovic, D., Neskovic-Konstantinovic, Z., Nikolic-Vukosavljevic, D., 2007, Prognostic value of HER2 gene amplification detected by chromogenic in situ hybridization (CISH) in metastatic breast cancer: *Exp Mol Pathol* 82:262-268.
- Tripathy, D., Slamon, D.J., Cobleigh, M., Arnold, A., Saleh, M., Mortimer, J.E., Murphy, M., and Stewart, S.J., 2004, Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression: *J Clin Oncol*, v. 22, p. 1063-70.
- Tubbs, R.R., Pettay, J.D., Roche, P.C., Stoler, M.H., Jenkins, R.B., and Grogan, T.M., 2001, Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message: *J Clin Oncol*, v. 19, p. 2714-21.
- Tuma, R.S., 2005, Trastuzumab trials steal show at ASCO meeting: *J Natl Cancer Inst*, v. 97, p. 870-1.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., and Yarden, Y., 1996, A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor: *Mol Cell Biol*, v. 16, p. 5276-87.
- van de Vijver, M.J., 1993, Molecular genetic changes in human breast cancer: *Adv Cancer Res*, v. 61, p. 25-56.
- van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A., 1994, Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways: *Annu Rev Cell Biol*, v. 10, p. 251-337.

- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726).
- Wada, T., Qian, X.L., and Greene, M.I., 1990, Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function: *Cell*, v. 61, p. 1339-47.
- Wasielowski, R., Hasselmann, S., Ruschoff, J., Fisseler-Eckhoff, A., Kreipe, H. 2008 Proficiency testing of immunohistochemical biomarker assays in breast cancer. *Virchows Arch*; 453(6):537-543.
- WHO 2003. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. IARC Press 2003; Lyon:9-112.)
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M., and Hayes, D.F., 2007, 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*, v. 131, p. 18-43.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de V, Wheeler, T.M., Hayes, D.F. 2007a American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*; 25(1):118-145.

- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de, V, Wheeler, T.M., Hayes, D.F. 2007b American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*; 25(1):118-145.
- Yaziji, H., Goldstein, L.C., Barry, T.S., Werling, R., Hwang, H., Ellis, G.K., Gralow, J.R., Livingston, R.B., and Gown, A.M., 2004, HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods: *Jama*, v. 291, p. 1972-7.
- Zhang, D., Salto-Tellez, M., Do, E., Putti, T.C., and Koay, E.S., 2003, Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays: *Hum Pathol*, v. 34, p. 362-8.
- Zhang, H., Ren, G., Wang, X., Zhao, J., Yao, H., Bai, Y., Bo, W. 2012, HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) compared with immunohistochemistry (IHC) in breast cancer: a study of 528 equivocal cases: *Breast Cancer Res Treat.*, July 2012 v. 134, p.743-9.

## **7. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn PD Dr. med. Jozef Zustin danke ich für die Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem histologischen Labor am Institut für Pathologie an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf bedanke ich mich für die intensive Mitarbeit bei der Herstellung des Gewebemultiblocks, für die konstruktiven Vorschläge und wichtigen Hinweise bei der Umsetzung der Thematik.

Meinen ganz besonderen und persönlichen Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit stets mit viel Geduld und Fürsorge unterstützt haben.

Danke!

## **8. Lebenslauf**

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

### **Eidesstattliche Versicherung**

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 zur Promotion beworben habe.

Unterschrift.....