

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktorin der Klinik: Prof. Dr. Ingrid Moll

**Expression von Protoonkogenen der EGFR Tyrosinkinase Rezeptoren Familie  
in epithelialen und melanozytären Hauttumoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Florian Löhr

aus Mainz

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 12.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der /die Vorsitzende: Prof. Dr. Ingrid Moll

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Johanna Brandner

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	II
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1. Die EGF-Rezeptoren</b>	1
<b>1.2. Struktur und Funktion der Rezeptoren</b>	2
1.2.1. Liganden	3
1.2.2. Dimerisierung	5
1.2.3. Signaltransduktion in der Zelle	7
<b>1.3. Die EGF-Rezeptoren in der Entwicklung</b>	8
<b>1.4. Bedeutung der EGF-Rezeptoren bei Malignomen</b>	9
1.4.1. Therapeutische Optionen bei Malignomen	10
<b>2. Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	12
<b>3. Material und Methoden</b>	14
<b>3.1. Material/Präparate</b>	14
<b>3.2. Methode</b>	15
3.2.1. Protokoll der immunhistochemischen Färbung	13
3.2.2. Kriterien der Bewertung/Färbeintensität	17
<b>4. Ergebnisse</b>	19
<b>4.1. Auswertung Ergebnisse</b>	32
<b>5. Diskussion</b>	38
<b>5.1. Bewertung der zytoplasmatischen Färbeprodukte</b>	38
<b>5.2. Die EGF-Rezeptoren in normaler Epidermis</b>	40
<b>5.3. Expression der Rezeptoren in epidermalen Tumoren</b>	42
<b>5.4. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Daten aus der Literatur</b>	43
<b>5.5. Expression der Rezeptoren bei malignen Melanomen</b>	48
<b>5.6. Vergleich der immunhistochemischen Reaktionsmuster</b>	50
<b>6. Zusammenfassung</b>	52
<b>Literaturverzeichnis</b>	54
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	
<b>Erklärung</b>	

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC-Standardperoxidase	konjugierte Avidin-Biotin-Methode
AK	Aktinische Keratose
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Amphiregulin
BCC	Basalzellkarzinom
°C	Grad Celsius
CARD	catalyzed reporter deposition
DAB-Substrat	3,3-Diaminbenzidin
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Epiregulin
FGF	fibroblast growth factor
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor receptor
HER	human epidermal growth factor receptor
HGF	human growth
HP	humane Papilloma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IGF	insulin like growth factor
IHC	Immunhistochemie
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Malignes Melanom
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NDF	neu differentiation factor
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NRG	Neuregulin
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase

PDGF	platelet derived growth factor
SCC	Spinozelluläres Karzinom
Stlsg.	Stammlösung
Tab.	Tabelle
TGF- $\alpha$	transforming (tumor) growth factor
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
$\mu\text{m}$	Mikrometer
W	Watt

## 1. Einleitung

### 1.1. Die EGF-Rezeptoren

Aufbau, Entwicklung, Differenzierung und Wachstum der Epidermis werden durch eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren beeinflusst. An den Oberflächen der Epithelien lokalisierte, strukturell vielfältige Rezeptoren steuern dabei sowohl hormonelle Einflüsse als auch den Stimulus von Wachstumsfaktoren durch die Kontrolle transmembranöser Signalwege und in der Folge der Reaktionsprodukte (De Laat et al. 1999, Olayioye et al. 1998, Prenzel et al. 2001). Insbesondere die Funktion der Keratinozyten wird durch Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle beeinflusst. Zu den Wachstumsfaktoren, die bis heute identifiziert wurden gehören der EGF, PDGF, FGF, IGF, NGF, HGF und TGF- $\alpha$ . EGF und dem TGF- $\alpha$  sind hervorzuheben, weil durch sie die Proliferationsaktivität der Keratinozyten wesentlich reguliert wird. Die Mitglieder der EGF-Familie (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin und die Neureguline 1-4) korrespondieren zum Teil mit speziellen Rezeptoren der EGFR-Familie (ErbB1-4). ErbB1-Interaktionen mit seinen bevorzugten Partnern der EGF-Familie (EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, AR und ER) sind für das Wachstum der epidermalen Zellen von essentieller Bedeutung, was sich in einer differenzierten Induktion der mRNA-Expression ausdrückt (Hashimoto et al. 2000).

Die Beobachtung einer Überexpression der EGFR-Familie bei verschiedenen malignen Neoplasien ist von hoher klinischer Relevanz und Basis einer zusätzlichen zielgerichteten Therapie durch Blockade der Rezeptoren. So ist bekannt, dass bei circa 30 Prozent der Mammakarzinome eine Überexpression des ErbB2 mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist. Durch eine zusätzliche Blockade des ErbB2 mit einem rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) kann eine bessere Prognose erreicht werden. In jüngerer Zeit wurde für Patienten

mit colorektalen Karzinomen auf der Basis einer Überexpression des ErbB1 ein entsprechende Immuntherapie entwickelt (Klapper et al. 2000, Mamot et al. 2005 & 2006, Mendelsohn 2004).

## 1.2. Struktur und Funktion der Rezeptoren

Die EGFR-Familie wird in die Klasse I der Wachstumsfaktor-Rezeptoren eingeteilt (Lupu et al. 1995, Rajkumar und Gullick 1994, Tzahar et al. 1996). Wachstumsfaktoren sind Proteine, die durch die Bindung an spezifische Rezeptoren wie der EGFR-Familie, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch stimulierende Wirkung auf die DNA-Synthese fördern (Heldin 1995). Aufgabe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist die Signaltransduktion in die Zelle, d.h. die extrazellulären Signale in intrazelluläre umzusetzen und an den Zellkern weiterzuleiten. Sie stellen somit einen wichtigen Bestandteil des Zellzyklus dar.

Es sind bis heute vier verschiedene Mitglieder in der Familie bekannt: ErbB1 (Ullrich et al. 1984), ErbB2 (Coussens et al. 1985), ErbB3 (Kraus et al. 1989, Guy et al. 1994) und ErbB4 (Plowman et al 1993). Während Sie sich untereinander von ihrem korrespondierenden Gen als auch in ihrem Gewicht (160-185 kDa) unterscheiden, kennzeichnet sie eine große Homologie in ihrer Sequenz, Tertiärstruktur und ihrem Funktionsprinzip (Rubin und Yarden 2001, Tzahar et al. 1996). Sie sind sich in ihrem Grundaufbau ähnlich: eine extrazelluläre Domäne als Kontaktpunkt zwischen Ligand und Rezeptor, eine transmembranöse lipophile Domäne zur Verankerung in der Zellmembran und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität und einem terminalen Aminosäureschwanz sind bei allen 4 Rezeptoren nachweisbar (Carpenter et al. 1987, van der Geer et al. 1994, Klapper et al. 2000, Rubin und Yarden 2001, Yarden 1990). Unterschiede bestehen jedoch bei den Subtypen der EGFR-Familie vor allem bei der zytoplasmatischen Domäne und dem Aminosäureschwanz (Dougall et al. 1994). So besitzt beispielsweise ErbB3 eine

nicht-funktionsfähige Tyrosinkinase ohne Möglichkeit der Weiterleitung des Signals in die Zelle (Guy et al. 1994, Stein et al. 2000).

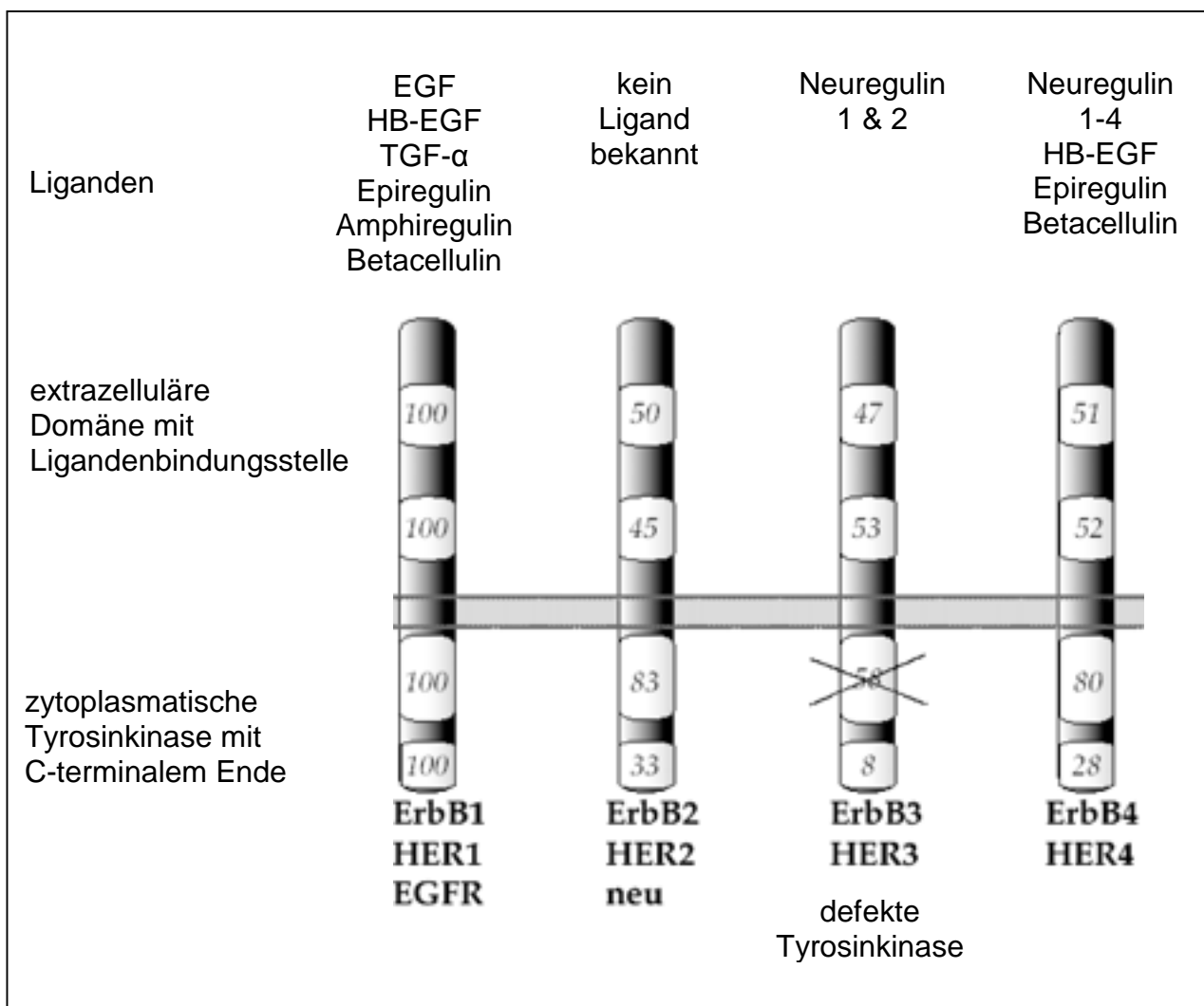
Bindet sich ein Ligand an die extrazelluläre Domäne, kommt es zu einer Homodimerisierung aus zwei gleichartigen bzw. zu einer Heterodimerisierung aus zwei verschiedenen Rezeptoren (Alroy und Yarden 1997). Diese Dimerisierung führt nachfolgend zu einer Änderung des Konformationszustands des Rezeptorkomplexes und gleichzeitig zu einer Aktivierung der zyttoplasmatisch gelegenen Tyrosinkinase durch Autophosphorylierung (Heldin 1995, Weiss und Schlessinger 1998). Erst in diesem Zustand kann durch Phosphorylierung und Aktivierung unterschiedlicher spezifischer Transmittermoleküle, das Signal über eine Transduktionskaskade an den Zellkern weitergegeben werden. Das Resultat der unterschiedlichen Transkriptionsprozesse im Zellkern ist eine gesteigerte Zellproliferation, vermehrte Zelldifferenzierung und erhöhte Zellmotilität (Hynes und Stern 1994, Yamauchi et al. 2001).

### 1.2.1. Liganden

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne der EGF-Rezeptoren ist der erste Schritt auf dem Weg des Signals zum Zellkern. Bisher sind der EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin und die Neureguline 1-4 als spezifische Liganden identifiziert worden. Sie alle besitzen eine EGF-ähnliche Domäne mit der sie in der Lage sind, an den Rezeptor zu binden. Die unterschiedlichen Liganden haben spezifische Bindungspartner: EGF, TGF- $\alpha$  und Amphiregulin verbinden sich bevorzugt mit ErbB1, HB-EGF, Epiregulin und Betacellulin sowohl mit ErbB1 als auch mit ErbB4 (Gulliford et al. 1998, Komurasaki et al. 1997, Olayioye et al 2000, Shelly et al. 1998, Yarden 2001). Die Gruppe der Neureguline umfasst vier Typen. Während sich NRG1 und NRG2 (Riese et al. 1995) an ErbB3 und ErbB4 koppeln können, bilden die später entdeckten NRG3 (Zhang et



al. 1997) und NRG4 (Harari et al. 1999) ausschließlich mit ErbB4 einen Komplex. Trotz dieser vielfältigen Liganden konnte bisher kein Wachstumsfaktor gefunden werden, der mit ErbB2 ligiert (Graus-Porta et al. 1995, Klapper et al. 2000, Wada et al. 1990) (Abb.1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Liganden, Rezeptoren und des strukturellen Aufbaus der EGF-Rezeptoren.**

### 1.2.2. Dimerisierung

Nach Bindung eines Liganden erfolgt durch Homo- bzw. Heterodimerisierung zwischen zwei Rezeptoren und der gegenseitigen intrazellulären Phosphorylierung des Tyrosins eine Konformationsänderung des Komplexes (De Laat et al. 1999, Sweeney et al. 2000). Auch hier gibt es bei der Dimerisierung der Rezeptoren

bevorzugte Bindungspartner (Abb. 2). So spielt ErbB2, obgleich er keinen spezifischen Liganden besitzt und somit als Homodimer nur eine schwache Signalfunktion ausüben kann, als Co-Rezeptor eine besondere Rolle. Zum einen ist er der Rezeptor, mit dem alle anderen Rezeptoren bevorzugt eine Heterodimerisierung eingehen (Beerli et al. 1995, Chamberlin et al. 1998, Graus-Porta et al. 1997, Klapper et al. 2000, Pinkas-Kramarski et al. 1996 & 1998, Tzahar et al. 1997, Wang et al. 1998). Von besonderer Bedeutung ist hier die Heterodimerisierung zwischen ErbB1 und ErbB2 (Tzahar et al. 1996). Zum anderen kann das Signal von Heterodimeren mit ErbB2 verstärkt und länger weitergegeben werden. Dies erklärt sich durch eine höhere Stabilität der Heterodimere mit der Folge, dass sie länger an der Zelloberfläche verbleiben und ein längerfristiger Impuls des Signals dadurch möglich ist (Lenkferink et al. 1998, Yarden et al. 2001). Des Weiteren konnte eine verminderte Dissoziationsrate des Liganden vom ErbB2-Rezeptorenkomplex und somit eine Verstärkung der Signaltransduktion beobachtet werden (Karunagaran et al. 1996, Yarden et al. 2001). Die Inaktivierung erfolgt durch Endozytose des Rezeptorenkomplexes in die Zelle (Ceresa et al. 2000). Hier kommt es entweder zu einem Recyclen oder zu einem Abbau des Heterodimer in Lysosomen (Waterman et al. 1998). Dabei fällt auf, dass die Heterodimere mit ErbB2 häufiger zum Wiederaufbau verwendet als komplett abgebaut werden. Dadurch gelangen diese Heterodimere erneut an die Zelloberfläche und können erneut aktiviert werden (Alroy et al. 1997, Klapper et al. 2000).

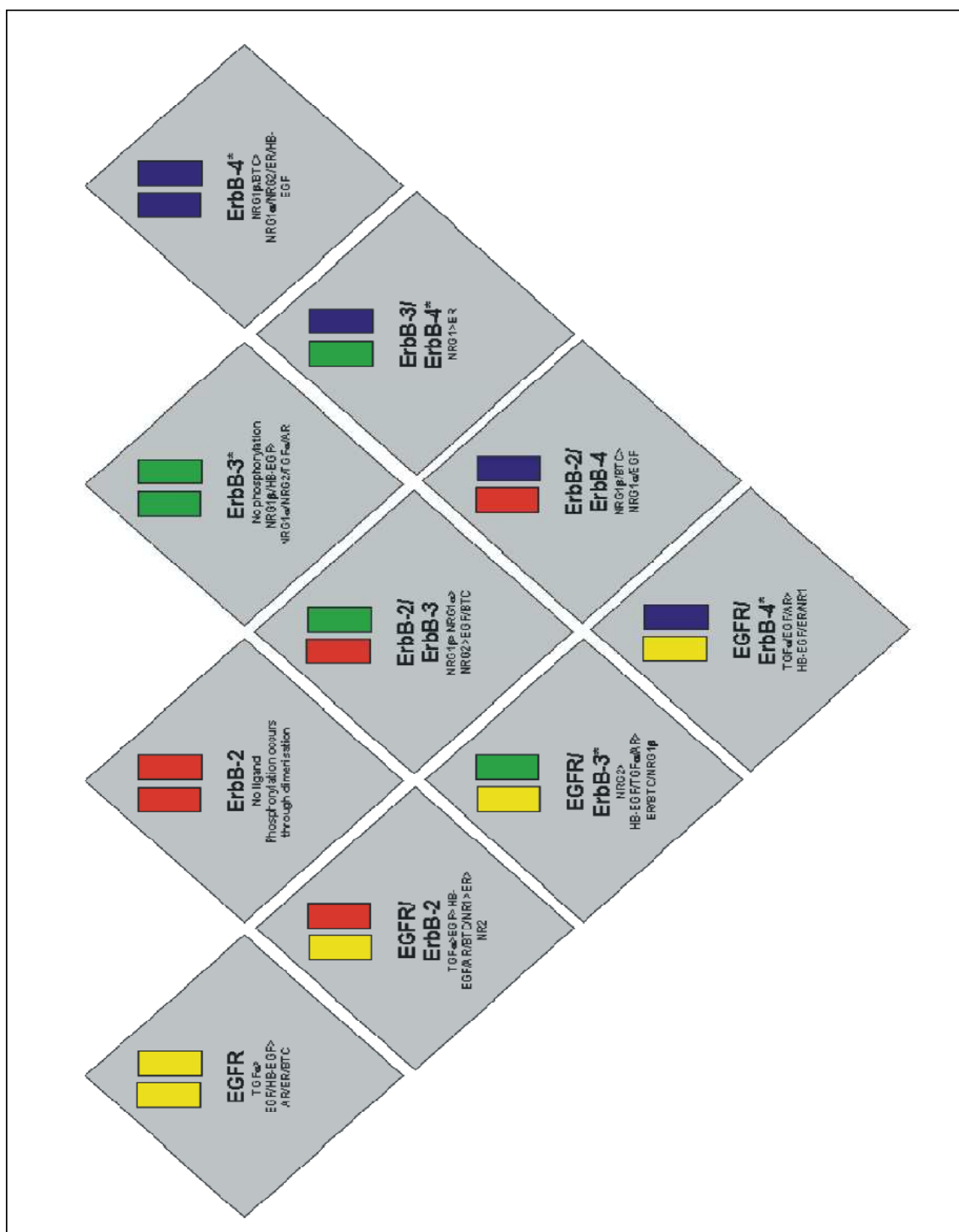


Abb. 2: Schematische Darstellung der Dimerisierungsmöglichkeiten und Liganden der EGFR-Familie. \* Eine Homodimerisierung erfolgt nur in Abwesenheit von ErbB2.

### 1.2.3. Signaltransduktion in der Zelle

Die durch Liganden ausgelöste Dimerisierung führt zu einer Phosphorylierung durch die intrazelluläre Tyrosinkinase der Rezeptoren. Die Residuen der Tyrosinkinase besitzen eine SH2- oder PTB-Domäne, die an die Adaptorproteine oder –enzyme gebunden werden (Sweeney et al. 2000). Als zytoplasmatische Adaptorproteine, die mit den Residuen der EGFR-Phosphorproteine reagieren, sind unter anderem das Shc, Grb2, Crk, Dok-R dargestellt worden. Diese Adaptorproteine können nun ihrerseits Enzymkaskaden wie zum Beispiel die MAPK-Familie aktivieren und so das Signal über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren an den Zellkern weiterleiten (Prenzel et al. 2001, Klapper et al. 2000, Olayioye et al. 1998 & 2001). Nach einer Dimerisierung der Rezeptoren an der Membran kommt es durch unterschiedliche Aktivierungswege und Kaskaden zu einer Signaltransduktion in die Zelle. Durch eine Überexpression von ErbB2 wird das Signal verstärkt und verlängert in die Zelle übermittelt, und es kann zu einer malignen Entartung der Zelle kommen (Abb. 3).

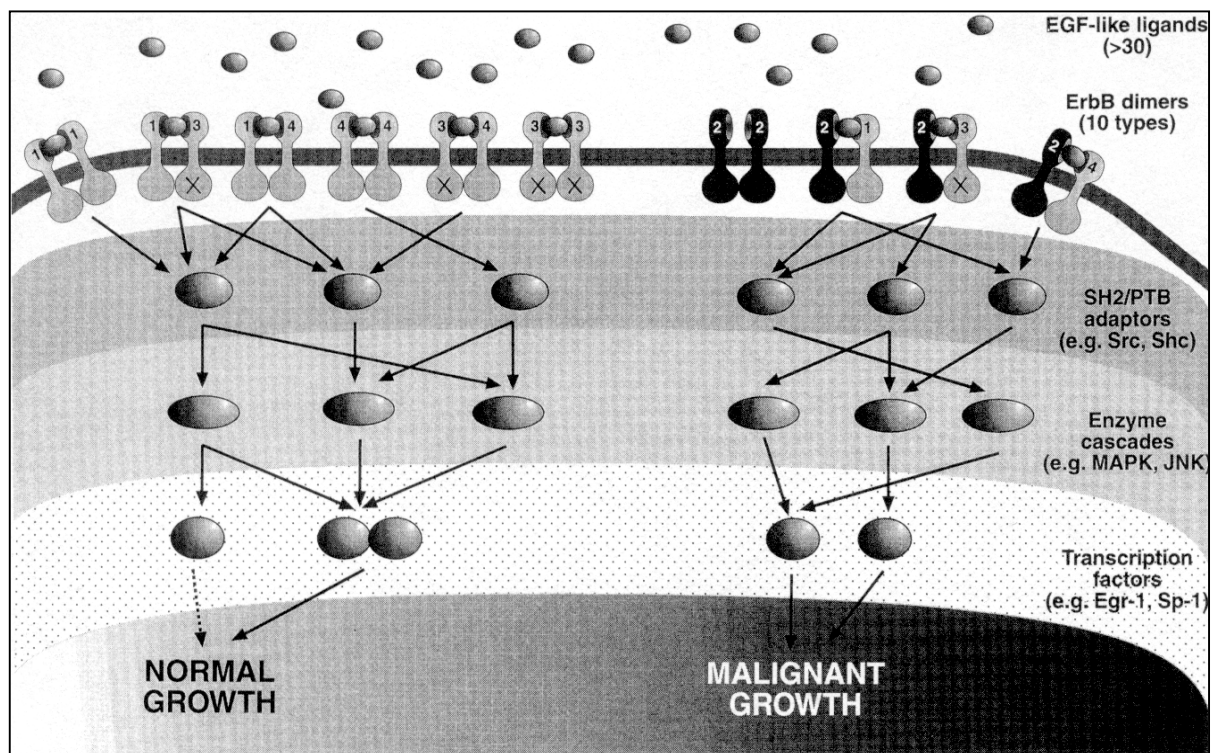


Abb. 3: Intrazelluläre Signaltransduktionkaskaden der EGF-Rezeptoren (Klapper et al. 2000).

### 1.3. Die EGFR in der Entwicklung

In der Evolutionsgeschichte entwickelte sich die EGFR-Familie von einem Rezeptor mit einem Liganden bei *Caenorhabditis elegans*, über einen Rezeptor und vier unterschiedlichen Liganden bei *Drosophila* zu vier Rezeptoren mit vielfältigen Liganden bei den Wirbeltieren (Olayioye et al. 2000).

EGF-Rezeptoren werden in verschiedenen epithelialen, mesenchymalen und neurogenen Geweben exprimiert. Sie sind für die Entwicklung, Proliferation und Differenzierung des Gewebes unabdingbar (De Potter et al. 2001, Gresik et al. 1998, Hashimoto 2000, Peus et al. 1997, Zambruno et al. 1990). Einer Zerstörung der EGF-Rezeptoren, insbesondere des ErbB1 und ErbB2, folgen nachhaltige Entwicklungsstörungen. Der Verlust des ErbB1 ist bei Mäusen Ursache gravierender Anlagestörungen des Gehirns (Britsch et al. 1998), der Haut (Kiguchi et al. 2000), der Lunge und des Gastrointestinaltrakts mit der Folge einer erhöhten embryonalen und perinatalen Sterblichkeit. Mäuse ohne ErbB2 oder ErbB4 sterben noch in der Gestationsphase an Missbildungen des Herzens (Gassmann et al. 1995, Lee et al. 1995). Herzmissbildungen werden auch bei Fehlen des ErbB3 beobachtet (Erickson et al. 1997). Die EGF-Rezeptoren spielen darüber hinaus in der postnatalen Entwicklung der Organe, insbesondere bei der Mamma, eine überragende Rolle. Hier sind für die normale Entwicklung und Funktion des Organs alle EGF-Rezeptoren unverzichtbar (De Potter et al. 2001).

### 1.4. Bedeutung der EGFR-Familie bei Malignomen

Sowohl in nicht-neoplastischen (King et al. 1990) wie neoplastischen Erkrankungen ist das komplexe EGFR-Signalsystem involviert, was sich sowohl in einer Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität als auch einer gesteigerten Genexpression ausdrückt (Gullick 1991). Bei einer Infektion mit Hepatitis B- oder Epstein-Barr-Viren erfolgt eine Aktivierung der EGFR, während HP-Viren den endosomalen Abbau aktivierter

Rezeptor-Liganden-Komplexe unterdrückt (Yarden 2001). Nachdem zunächst die Aktivierung eines humanen EGFR (ErbB1) im Kontext mit dem viralen Onkogen v-erbB entdeckt war, gelang die Abgrenzung eines zweiten EGFR-ähnlichen Phosphorproteins an Tumorzellen des zentralen Nervensystems im Tierversuch. Dieses Phosphorprotein wurde als Neu-Onkoprotein bezeichnet. Dem Analogon in humanen Neoplasien wurde die Bezeichnung HER2 (human EGF receptor 2) oder ErbB2 zugeordnet. In weiteren DNA- und mRNA-Analysen gelang die Isolierung des ErbB3 und ErbB4. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten unterscheiden sich die EGF-Rezeptoren durch die Kopplung der Liganden und die Bildung von Dimeren bzw. Heterodimeren. Ihre Einflussnahme auf Proliferation und Differenzierung insbesondere bei epithelialen Zellen wird durch die Beobachtung erhärtet, dass bei manchen Karzinomen eine Überexpression der Rezeptoren oder ihrer Liganden vorliegen kann (Gullick 1991, Veale et al. 1989). Diese Daten erklären das große Interesse an diesen Mechanismen und die Frage nach ihrer Bedeutung für die Entstehung, Prognose und Therapiestrategien bei Krebserkrankungen.

Dem ErbB2-Protein kommt in diesen Überlegungen deshalb eine Sonderstellung zu, weil es im Gegensatz zu ErbB1, ErbB3 und ErbB4 am häufigsten überexprimiert wird (Holbro et al. 2003, Klapper et al. 1999). Diese Überexpression kann sowohl im Serum als auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Ein hoher ErbB2-Serumspiegel signalisiert bei Mamma- und Ovarialkarzinomen eine schlechte Prognose, ein vermindertes Ansprechen auf eine Hormontherapie bei Östrogen-positiven Patientinnen bzw. auf eine Chemotherapie (Hynes et al. 1994, McCann et al. 1990). Für ErbB2-positive Karzinome des weiblichen Genitale (Slamon et al. 1989), der Prostata, des Gastrointestinaltrakts (Fukushige et al. 1986), des Pankreas und der Lungen sowie weiterer Organe liegen ähnliche Erfahrungen vor (Koeppen et al. 2001).

Zugleich ist auch eine pathologische Überexpression des ErbB1 in zahlreichen Karzinomen unterschiedlicher Organe beobachtet werden (Mendelsohn 2004). Die Bedeutung des ErbB3 und ErbB4 bei Karzinomen ist noch nicht abschließend beurteilbar.

#### 1.4.1. Therapeutische Optionen bei Malignomen mit Überexpression der EGFR-Familie

Der Nachweis einer Überexpression des ErbB2 gelingt zum einen durch eine Bestimmung seines Serumspiegels, zum anderen durch immunhistochemische Untersuchungen am Tumorgewebe und eine ErbB2-Amplifikation durch FISH und cdPCR. Die US Food and Drug Administration (FDA) befürwortet den immunhistochemischen DAKO-Herceptest<sup>®</sup> als Basis einer Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)-Therapie, die auf der Gabe monoklonaler Antikörper gegen ErbB2 basiert. Die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse korrelieren in hohem Maße mit der durch die FISH-Technik nachgewiesenen Genamplifikation: bei einem IHC-Score 0 (negativ) beträgt die Übereinstimmung mit FISH 100%, bei einem IHC-Score 1+ (negativ) 99%, IHC-Score 2+ (positiv) 30 % und bei einem IHC-Score 3+ (positiv) 97% (Böcker et al. 2006, DiGiovanna et al. 1999). Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse führen unterschiedliche Daten und Interpretationen des zellulären Färbemusters auf. So wurden Ergebnisse sowohl über ein rein membranöse als auch über ein kombinierte membranöse/zytoplasmatische Färbung berichtet (De Potter et al. 1989a & 1989b, Koeppen et al. 2001, Press et al. 1994). Die positive zytoplasmatische Reaktion wird der intrazellulären Domäne des ErbB2 zugeordnet. Die zytoplasmatische Reaktion soll Ausdruck einer positiven Prognose sein (Têtu et al. 1994). Da jedoch nur die membrangebundene Reaktion mit einer Amplifizierung des ErbB2-Genes einhergeht, wie vielfach bei Mammakarzinomen beschrieben (Böcker et al. 2006), wird diese allein als Kriterium für eine ErbB2-

Überexpression zugelassen (Carter et al. 1992, Jacobs et al. 1999a & 1999b, Roche und Ingle 1999).



## 2. Arbeitshypothese und Fragestellung

In der Diskussion der Karzinogenese kommt der Alteration der EGF-Rezeptoren und ihrer Liganden, die über vielfältige intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose der Zellen in vielen Organen steuern, eine zentrale Bedeutung zu.

Dies ist auch durch den Nachweis einer Überexpression der verschiedenen Rezeptoren bei malignen Tumoren belegt (Brockhoff 2006, Klapper et al. 2001). So wird über eine Überexpression des Rezeptors ErbB1, verbunden mit einer signifikant hohen Metastasierungsrate und schlechter Prognose, bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge, invasiven Mamma-Karzinomen, Urothelkarzinomen der Harnblase, Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich, Prostatakarzinomen und colorektalen Karzinomen berichtet.

Bei Karzinomen der oben aufgeführten Organe ist darüber hinaus eine simultane Überexpression des ErbB2 bekannt. Die Überexpression dieses Rezeptors korreliert gleichfalls mit einer erhöhten Metastasierungs- und Rezidivrate sowie einer schlechten Prognose. Die Bedeutung einer Expression oder Überexpression von ErbB3 und ErbB4 für die Krankheitsverläufe ist noch nicht abschließend beurteilbar (Klapper et al. 2001).

Auch in der Haut, insbesondere in der Epidermis, beeinflussen die EGFR-Familie und ihre spezifischen Wachstumsfaktoren viele Funktionen, so bei der Wundheilung und der Psoriasis vulgaris ist ein verstärktes Auftreten der EGF-Rezeptoren und ihrer Liganden zu beobachten. Daher soll versucht werden das Expressionsmuster von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 bei epidermalen Präkanzerosen, malignen epidermalen Tumoren und malignen Melanomen mittels immunhistochemischer Untersuchungen darzustellen. ErbB1 wurde nicht berücksichtigt, weil zum Zeitpunkt der

Untersuchungen im Gegensatz zum ErbB2 bei Mamma-Karzinomen noch keine gegen den Rezeptor gerichtete Therapie bekannt war.

### **3. Material und Methoden**

#### 3.1. Material und Präparate

Formalin-fixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben von Tumoren mit histologisch verifizierten Diagnosen: Aktinische Keratosen, Basalzellkarzinome, spinozelluläre Karzinome und maligne Melanome wurden verwendet. Bei allen Fällen handelte es sich um Primärmanifestationen. Bei der immunhistochemischen Bewertung fanden Alter und Geschlecht der Patienten/innen, Entnahmeort, histologischer Typ und Grading, bei den malignen Melanomen weder Clark-Level noch Breslow-Index. Bei keinem der Tumoren lagen Hinweise auf eine perineurale, lymphangische oder hämatogene Propagation vor. In keinem der Fälle waren Lymphknoten - oder Fernmetastasen bekannt.

Circa 4 µm dicke Schnitte wurden nach der ABC-Methode immunhistochemisch gefärbt und semiquantitativ ausgewertet (Färbeintensitätsskala:0-3). Als Negativkontrolle dienten Präparate ohne Primär-Antikörper. Die Positivkontrolle war ein invasiv-ductales Mamma-Karzinom mit immunhistochemisch nachgewiesener und durch FISH-Analyse bestätigter Überexpression des ErbB2. In einem Färbegang waren die jeweiligen Hautpräparate (Basalzellkarzinom, spinozelluläres Karzinom, malignes Melanom, aktinische Keratosen), normale Haut und das Mamma-Karzinom zusammengeschlossen. Das Mamma-Karzinom ist die Tumorentität, an der am häufigsten das Expressionsmuster der EGF-Rezeptoren, insbesondere des ErbB2, untersucht wurde. Ein Referenztumor bezüglich einer Überexpression von ErbB3 und ErbB4 ist nicht bekannt.

Da schon bei normaler Epidermis quantitative Veränderungen der Rezeptorbestände vom Stratum basale zu den darübergelegenen Schichten bekannt sind, werden bei allen Tumoren die zentralen Partien, die seitlichen Tumorränder und die

Junktionsbereiche zum Stroma untersucht, um eventuell auftretene Änderungen der Färbeintensitäten zu erfassen (Stoll et al. 2001). Neben der membranösen Reaktion wurde das zytoplasmatische Reaktionsprodukt (granulär/punktförmig/diffus) erfasst.

### 3.2. Methode

#### 3.2.1. Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Formalin-fixierte und paraffin-eingebettete Resektionspräparate: 4 µm dicke Schnitte, getrocknet bei 37°C (über Nacht)

1. Basalzellkarzinom	20 Gewebeproben
2. Spinalzellkarzinom	19 Gewebeproben
3. Malignes Melanom	18 Gewebeproben
4. Aktinische Keratose	20 Gewebeproben
5. Normale Haut	1 Gewebeproben
6. Normale behaarte Haut	1 Gewebeproben
7. Mammakarzinom (Stadium 3+) als Positivkontrolle	1 Gewebeproben

#### Vorbereitung der Präparate:

- Xylol Bäder 2 x 10 min
- Bäder in absteigender Alkoholkonzentration von 100%-70% jeweils 5 min
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quench: 0,3% (3% = 2ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 198ml 100% Alkohol) 5 min
- TRIS-Puffer Bad 10 min
- Mikrowelle 3 x 2 min bei 580 W
- TRIS-Puffer Bad zum Abkühlen der Präparate

Prä-Inkubation in 2% normalem Ziegenserum (NGS in TRIS) 20 min bei Raumtemperatur

Primärinkubation der Präparate:

- ErbB2 polyklonaler Antikörper (Hase), Santa Cruz Biotech.<sup>®</sup>:  
1:100 + 2% normales Ziegen Serum (NGS in TRIS)
- ErbB3 polyklonaler Antikörper (Hase), Santa Cruz Biotech.<sup>®</sup>:  
1:20 + 2% normales Ziegen Serum (NGS in TRIS)
- ErbB4 polyklonaler Antikörper (Hase), Santa Cruz Biotech.<sup>®</sup>:  
1:100 + 2% normales Ziegen Serum (NGS in TRIS)

Über Nacht Inkubation bei Raumtemperatur

3 x 5 min TRIS-Puffer Bäder

Sekundärinkubation :

- biotinylierter Ziege anti-Hase Antikörper (Vectastain<sup>®</sup> ABC-Standardperoxidase-Set): 1:200 + 2% normales Ziegen Serum (NGS in TRIS) 30 min bei Raumtemperatur

3 x 5 min TRIS-Puffer Bäder

Färbung:

- ABC-Standard-Peroxidase-Detection Vectastain<sup>®</sup> ABC-Standardperoxidase-Set  
30 min bei Raumtemperatur

3 x 5 min TRIS Bäder

- DAB-Substrat (Biologo<sup>®</sup> DAB-Substrat-Kit) kurz, unter mikroskopischer Kontrolle

Um die Färbereaktion zu stoppen: Bäder in Aqua dest.

Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin

Dehydratation (Bäder in aufsteigender Alkoholreihe sowie abschließend in Xylol) und nachfolgend Einbettung mit Eukitt.

Substanzen:

Alle Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, USA hergestellt.

ErbB2: Polyklonaler Antikörper (Hase) gegen das C-terminale Ende des humanen Rezeptors

ErbB3: Polyklonaler Antikörper (Hase) gegen das C-terminale Ende des humanen Rezeptors

ErbB4: Polyklonaler Antikörper (Hase) gegen das C-terminale Ende des humanen Rezeptors

Citratpuffer:

Stammlösung A: 21,01g Citronensäure-Monohydrat in 1000ml Aqua dest.

Stammlösung B: 29,41g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1000ml Aqua dest.

Gebrauchsfertig: 9ml Stlsg. A + 41ml Stlsg. B auf 500ml aqua dest (pH 6,0)

TRIS-Puffer:

Stammlösung: 60,57g Trishydroxymethyl-aminomethan in 500ml Aqua dest. + 400ml HCL; Rest auf 1000ml auffüllen

Gebrauchsfertig: 8,78g NaCl in 900ml Aqua dest. + 100ml TRIS-Stlsg. (pH 7,6)

### 3.2.2. Kriterien der Bewertung und Färbeintensität

Bewertung der Färbeintensität des Zytoplasma von 0-3 in 40-facher Vergrößerung.

Bewertungssystem und Kriterien der Farbintensität (Zytoplasma):

0 = keine Färbung

1 = schwache Färbung von bis zu 100 % der Zellen

2 = moderate und komplette Färbung von >50 % der Zellen

3 = starke und komplette Färbung von >50 % der Zellen

Das oben aufgeführte Bewertungssystem orientiert sich an den Bewertungskriterien des HercepTest<sup>®</sup> von Dako<sup>®</sup> zur Interpretation und Beurteilung der ErbB2-Überexpression beim Mammakarzinom. Dieser beurteilt ausschließlich die Färbeintensität der Zellmembran ohne die zytoplasmatische Färbung der Zellen zu

berücksichtigen, da sie in dem HercepTest<sup>®</sup> als unspezifisch zu betrachten ist (Abb.4).

Die Untersuchungsergebnisse wurden zum Teil mit dem Mann-Whitney-Test aufgearbeitet.

Abb. 4: Kriterien der Färbeintensität der Zellmembran des HercepTest<sup>®</sup>

<b>Färbemuster</b>	<b>Score</b>	<b>Beurteilung der ErbB2-Überexpression</b>
Keine Färbung zu sehen oder weniger als 10% der Tumorzellen.	0	Negativ
Eine schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen. Inkomplette Membranfärbung.	1+	Negativ
Schwache bis moderate komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen.	2+	Schwach positiv
Starke komplette Membranfärbung von mehr als 10% der Tumorzellen	3+	Stark positiv

#### 4. Ergebnisse

**Tab. 1: Färbeprotokoll ErbB2 bei Basalzellkarzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor - zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
BCC 1 276-00	1 c	1 c	1 c	1 c	2 c
BCC 2 701-00	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 3 635-00	1 c	1 c	0 c	0 c	0 c
BCC 4 184-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 5 624-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 6 444-00	2 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 7 518-00	2 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 8 555-00	2 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 9 565-00	2 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 10 239-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 11 2-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
BCC 12 631-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 13 189-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 14 492-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 15 126-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
BCC 16 695-00	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c
BCC 17 350-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
BCC 18 433-00	1 c	1 c	0 c	1 c	1 c
BCC 19 622-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 20 823-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. Mamma-Karzinom 3+ nach Dako-Score und inhomogener zytoplasmatischer Score bei verstreut liegenden Tumorzellen.



**Tab. 2: Färbeprotokoll ErbB3 bei Basalzellkarzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
BCC 1 276-00	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 2 701-00	1 c	3 c	1 c	2 c	2 c
BCC 3 635-00	1 c	2 c	1 c	2 c	1 c
BCC 4 184-00	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
BCC 5 624-00	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
BCC 6 444-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 7 518-00	3 c	3 c	1 c	2 c	2 c
BCC 8 555-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 9 565-00	1 c	2 c	2 c	1 c	1 c
BCC 10 239-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 11 2-00	1 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 12 631-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 13 189-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 14 492-00	2 c	2 c	1 c	2 c	2 c
BCC 15 126-00	0 c	1 c	0 c	0 c	1 c
BCC 16 695-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
BCC 17 350-00	0 c	2 c	1 c	0 c	1 c
BCC 18 433-00	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c
BCC 19 622-00	1 c	2 c	1 c	1 c	2 c
BCC 20 823-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar.

**Tab. 3: Färbeprotokoll ErbB4 bei Basalzellkarzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
BCC 1 276-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 2 701-00	1 c	2 c	3 c	3 c	3 c
BCC 3 635-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 4 184-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
BCC 5 624-00	2 c	2 c	3 c	2 c	2 c
BCC 6 444-00	3 c	3 c	2 c	2 c	2 c
BCC 7 518-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 8 555-00	2 c	1 c	1 c	1 c	2 c
BCC 9 565-00	1 c	1 c	2 c	1 c	2 c
BCC 10 239-00	1 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 11 2-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 12 631-00	1 c	1 c	2 c	2 c	3 c
BCC 13 189-00	1 c	1 c	1 c	2 c	2 c
BCC 14 492-00	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
BCC 15 126-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
BCC 16 695-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 17 350-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
BCC 18 433-00	0 c	0 c	2 c	2 c	3 c
BCC 19 622-00	1 c	2 c	2 c	2 c	2 c
BCC 20 823-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar.

**Tab. 4: Färbeprotokoll ErbB2 bei spinözellulären Karzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
SCC 1 298-00	0 c	1 c	1 c	0 c	1 c
SCC 2 386-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
SCC 3 1178-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
SCC 4 475-00			1 c	1 c	1 c
SCC 5 768-00	2 c	1 c	2 c	1 c	1 c
SCC 6 1586-00	0 c	0 c	1 c	1 c	2 c
SCC 7 2526-00	1 c	1 c	1 c	2 c	2 c
SCC 8 32482-00			0 c	1 c	1 c
SCC 9 29939-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
SCC 10 28348-00			0 c	1 c	1 c
SCC 11 7674-00			1 c	1 c	2 c
SCC 12 3806-00			2 c	2 c	2 c
SCC 13 4380-00			1 c	1 c	1 c
SCC 14 5506-00			1 c	1 c	1 c
SCC 15 4465-00			2 c	2 c	2 c
SCC 16 28996-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
SCC 17 27584-00			1 c	1 c	1 c
SCC 18 28411-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
SCC 19 28858-00			0 c	0 c	0 c
Negativkontrollen	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. Mamma-Karzinom 3+ nach Dako-Score und inhomogener zytoplasmatischer Score 1 bei verstreut liegenden Tumorzellen.

In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 5: Färbeprotokoll ErbB3 bei spinözellulären Karzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumorzentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
SCC 1 298-00	0 c	2 c	1 c	2 c	2 c
SCC 2 386-00	1 c	2 c	3 c	3 c	3 c
SCC 3 1178-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
SCC 4 475-00			3 c	3 c	3 c
SCC 5 768-00	1 c	1 c	2 c	3 c	3 c
SCC 6 1586-00	1 c	1 c	3 c	3 c	2 c
SCC 7 2526-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
SCC 8 32482-00			1 c	2 c	1 c
SCC 9 29939-00	0 c	2 c	0 c	0 c	0 c
SCC 10 28348-00			1 c	1 c	2 c
SCC 11 7674-00			2 c	1 c	2 c
SCC 12 3806-00			1 c	2 c	1 c
SCC 13 4380-00			2 c	2 c	2 c
SCC 14 5506-00			2 c	2 c	2 c
SCC 15 4465-00			1 c	1 c	1 c
SCC 16 28996-00	1 c	1 c	2 c	1 c	2 c
SCC 17 27584-00			1 c	2 c	2 c
SCC 18 28411-00	0 c	1 c	2 c	1 c	2 c
SCC 19 28858-00			1 c	1 c	1 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 6: Färbeprotokoll ErbB4 bei spinözellulären Karzinomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumorzentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
SCC 1 298-00	1 c	1 c	1 c	1 c	2 c
SCC 2 386-00	1 c	1 c	2 c	2 c	3 c
SCC 3 1178-00	2 c	3 c	3 c	3 c	3 c
SCC 4 475-00			3 c	2 c	3 c
SCC 5 768-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
SCC 6 1586-00	1 c	2 c	2 c	2 c	3 c
SCC 7 2526-00	1 c	1 c	2 c	2 c	3 c
SCC 8 32482-00			1 c	2 c	2 c
SCC 9 29939-00	1 c	1 c	2 c	2 c	2 c
SCC 10 28348-00			1 c	2 c	2 c
SCC 11 7674-00			2 c	2 c	2 c
SCC 12 3806-00			1 c	1 c	2 c
SCC 13 4380-00			1 c	1 c	1 c
SCC 14 5506-00			2 c	2 c	3 c
SCC 15 4465-00			2 c	2 c	2 c
SCC 16 28996-00			2 c	2 c	1 c
SCC 17 27584-00			1 c	1 c	2 c
SCC 18 28411-00	2 c	2 c	2 c	2 c	2 c
SCC 19 28858-00			2 c	2 c	2 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 7: Färbeprotokoll ErbB2 bei malignen Melanomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
MM 1 1551-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 2 429-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 3 1077-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 4 951-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 5 1475-00	1 c	1 c	0 c	1 c	1 c
MM 6 1107-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 7 414-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
MM 8 1050-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 9 2501-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
MM 10 1712-01	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 11 1624-01	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 12 1819-01			1 c	1 c	1 c
MM 13 535-00			1 c	1 c	1 c
MM 14 1580-01			1 c	1 c	1 c
MM 15 1565-01	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 16 1397-01			1 c	1 c	0 c
MM 17 369-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
MM 18 973-00			0 c	0 c	0 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. Mamma-Karzinom 3+ nach Dako-Score und inhomogener zytoplasmatischer Score 1 bei verstreut liegenden Tumorzellen.

In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 8: Färbeprotokoll ErbB3 bei malignen Melanomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
MM 1 1551-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 2 429-00	0 c	1 c	0 c	1 c	1 c
MM 3 1077-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 4 951-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 5 1475-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 6 1107-00	2 c	2 c	0 c	1 c	0 c
MM 7 414-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 8 1050-00	1 c	1 c	1 c	0 c	2 c
MM 9 2501-00	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c
MM 10 1712-01	1 c	1 c	1 c	0 c	0 c
MM 11 1624-01	1 c	1 c	0 c	0 c	0 c
MM 12 1819-01			0 c	0 c	0 c
MM 13 535-00			1 c	1 c	1 c
MM 14 1580-01			1 c	1 c	0 c
MM 15 1565-01	1 c	1 c	0 c	0 c	0 c
MM 16 1397-01			1 c	1 c	0 c
MM 17 369-00	1 c	1 c	0 c	0 c	0 c
MM 18 973-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 9: Färbeprotokoll ErbB4 bei malignen Melanomen**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor-zentrum	Tumorrand	Tumor/Dermisgrenze
MM 1 1551-00	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 2 429-00	1 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 3 1077-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 4 951-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 5 1475-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 6 1107-00	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c
MM 7 414-00	1 c	1 c	1 c	1 c	1 c
MM 8 1050-00	1 c	1 c	1 c	2 c	2 c
MM 9 2501-00	2 c	2 c	0 c	0 c	0 c
MM 10 1712-01	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 11 1624-01	2 c	2 c	1 c	2 c	2 c
MM 12 1819-01			1 c	1 c	1 c
MM 13 535-00			1 c	1 c	1 c
MM 14 1580-01			1 c	1 c	1 c
MM 15 1565-01	2 c	2 c	1 c	1 c	1 c
MM 16 1397-01			2 c	1 c	1 c
MM 17 369-00	1 c	1 c	0 c	0 c	0 c
MM 18 973-00	3 c	3 c	2 c	2 c	2 c
Negativkontrollen	0 c	0 c	0 c	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.



**Tab. 10: Färbeprotokoll ErbB2 bei aktinischen Keratosen**

Probe	Tumorrand	Tumor
AK 1 1643-00		2 c
AK 2 192-00		1 c
AK 3 1578-00		1 c
AK 4 288-00		1 c
AK 5 1312-00		1 c
AK 6 152-00		2 c
AK 7 1082-00		2 c
AK 8 1663-00	2 c	2 c
AK 9 1412-00		1 c
AK 10 723-00		2 c
AK 11 535-00		1 c
AK 12 698-00	1 c	1 c
AK 13 1035-00	0 c	0 c
AK 14 485-00	1 c	1 c
AKI 15 733-00	1 c	1 c
AK 16 125-00	1 c	1 c
AK 17 301-00	1 c	2 c
AK 18 536-00	1 c	1 c
AK 19 1359-00	1 c	1 c
AK 20 137-00	1 c	1 c
Negativkontrollen	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. Mamma-Karzinom 3+ nach Dako-Score und inhomogener zytoplasmatischer Score 1 bei verstreut liegenden Tumorzellen.

In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 11: Färbeprotokoll ErbB3 bei aktinischen Keratosen**

Probe	Tumorrand	Tumor
AK 1 1643-00		2 c
AK 2 192-00		1 c
AK 3 1578-00		1 c
AK 4 288-00		2 c
AK 5 1312-00		2 c
AK 6 152-00		2 c
AK 7 1082-00		2 c
AK 8 1663-00	2 c	2 c
AK 9 1412-00		1 c
AK 10 723-00		2 c
AK 11 535-00		1 c
AK 12 698-00	2 c	2 c
AK 13 1035-00	2 c	2 c
AK 14 485-00	1 c	2 c
AKI 15 733-00	1 c	2 c
AK 16 125-00	2 c	2 c
AK 17 301-00	2 c	2 c
AK 18 536-00	1 c	1 c
AK 19 1359-00	2 c	2 c
AK 20 137-00	2 c	2 c
Negativkontrollen	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 12: Färbeprotokoll ErbB4 bei aktinischen Keratosen**

Probe	Tumorrand	Tumor
AK 1 1643-00		2 c
AK 2 192-00		2 c
AK 3 1578-00		1 c
AK 4 288-00		1 c
AK 5 1312-00		1 c
AK 6 152-00		2 c
AK 7 1082-00		2 c
AK 8 1663-00	1 c	1 c
AK 9 1412-00		1 c
AK 10 723-00		1 c
AK 11 535-00		2 c
AK 12 698-00	2 c	2 c
AK 13 1035-00	2 c	2 c
AK 14 485-00	2 c	2 c
AKI 15 733-00	2 c	2 c
AK 16 125-00	2 c	2 c
AK 17 301-00	2 c	2 c
AK 18 536-00	2 c	2 c
AK 19 1359-00	3 c	2 c
AK 20 137-00	2 c	3 c
Negativkontrollen	0 c	0 c

c = zytoplasmatisch. Bei allen Präparaten ist keine membranöse Färbung sichtbar. In Einzelfällen freibleibenden Feldern war keine Epidermis nachweisbar.

**Tab. 13: Färbeintensität der Kontrollen bei ErbB2**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor
Normale Epidermis	0 m, 1 c	0 m, 1 c	-
Positivkontrolle Mamma-Karzinom			3+ m, 1 c
Negativkontrollen	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c Mamma-Karzinom

m = membranös, c = zytoplasmatisch

**Tab. 14: Färbeintensität der Kontrollen bei ErbB3**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor
Normale Epidermis	0 m, 1 c	0 m, 1 c	-
Positivkontrolle Mamma-Karzinom			0 m, 1 c
Negativkontrollen	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c Mamma-Karzinom

m = membranös, c = zytoplasmatisch

**Tab. 15: Färbeintensität der Kontrollen bei ErbB4**

Probe	Epidermis basal	Epidermis suprabasal	Tumor
Normale Epidermis	0 m, 2 c	0 m, 2 c	-
Positivkontrolle Mamma-Karzinom			3+ m, 1 c
Negativkontrollen	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c normale Epidermis	0 m, 0 c Mamma-Karzinom

m = membranös, c = zytoplasmatisch

#### 4.1. Auswertung der Ergebnisse

Keines der Basalzellkarzinome, spinozellulären Karzinome, aktinischen Keratosen und malignen Melanome zeigte eine ErbB2-, ErbB3- und ErbB4-Expression im Niveau der Zellmembran.

##### Zytoplasmatisches Färbemuster bei Basalzellkarzinomen:

ErbB2: schwache zytoplasmatische Färbeintensität

ErbB3: moderate zytoplasmatische Färbeintensität

ErbB4: moderate bis starke zytoplasmatische Färbeintensität

Die zytoplasmatische Reaktion der Tumorzellen für ErbB2 ist niedriger als in Epithelien des Stratum basale, jedoch höher als im Stratum suprabasale unauffälliger Epidermis. Der Färbeintensität liegt auf der Höhe von Mamma-Karzinomen. Bei ErbB3 ist gleichfalls eine niedrigere Expression als im Stratum basale der normalen Epidermis feststellbar. Sie ist auch deutlich niedriger als beim Mamma-Karzinomen. Basalzellkarzinome exprimieren ErbB4 in gering höherem Maße als normale Epidermiszellen und der Epithelien der Mamma-Karzinome.

##### Zytoplasmatisches Färbemuster bei spinozellulären Karzinomen:

ErbB2: schwache bis moderate zytoplasmatische Färbeintensität

ErbB3: moderate zytoplasmatische Färbeintensität.

ErbB4: moderate bis starke zytoplasmatische Färbeintensität

Die zytoplasmatische Expressionsrate des ErbB2 ist mit der bei aktinischen Keratosen nahezu identisch, liegt jedoch gering unterhalb der normaler Epidermiszellen im Stratum basale. Mamma-Karzinome erreichen nicht die Farbintensität der Tumoren. Ein ähnliches Färbemuster auf höherem Level ist bei der

ErbB3-Expression zu erkennen. Beim ErbB4 übertrifft die Farbintensität der spinözellulären Karzinome marginal die der normalen Epidermis und deutlich die der Mamma-Karzinome.

Zytoplasmatisches Färbemuster bei aktinischen Keratosen:

ErbB2: schwache bis moderate zytoplasmatische Färbintensität

ErbB3: moderate zytoplasmatische Färbintensität

ErbB4: moderate bis starke zytoplasmatische Färbintensität

Das Expressionsmuster von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 ist mit dem bei spinözellulären Karzinomen identisch.

Zytoplasmatisches Färbemuster bei malignen Melanomen:

ErbB2: schwache zytoplasmatische Färbintensität

ErbB3: schwache zytoplasmatische Färbintensität

ErbB4: schwache bis moderate zytoplasmatische Färbintensität

Maligne Melanome erreichen nur die niedrigste zytoplasmatische Färbungsintensität bei ErbB2, ErbB3 und ErbB4 im Vergleich mit normaler Haut und den epidermalen Läsionen (BCC, SCC, AK).

Mamma-Karzinome:

Außer der erwarteten positiven membranösen ErbB2-Expression mit dem Dako—Score 3+ überraschte eine positive zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen in den drei Färbereihen.

Vergleich der zytoplasmatischen Reaktionsprodukte:

## ErbB2:

Bei Basalzellkarzinomen wird eine höhere zytoplasmatische Färbeintensität gegenüber den Epithelien im epidermalen Stratum basale beobachtet. Die Intensität übersteigt jedoch die des Stratum suprabasale.

Aktinische Keratosen und spinozelluläre Karzinome zeigen im Vergleich zu Basalzellkarzinomen eine höhere Expressionsrate, die jedoch etwas geringer ist als im epidermalen Stratum basale und die des Stratum suprabasale deutlich übersteigt.

Bei malignen Melanomen ist eine Färbeintensität nachzuweisen, die deutlich unter der der basalen Epidermis und der der aktinische Keratosen und spinozellulären Karzinomen liegt.

## ErbB3:

Die Färbeintensität des ErbB3 liegt insgesamt höher, als die des ErbB2. Das Verhältnis der Färbeintensitäten von Basalzellkarzinomen, aktinischen Keratosen und spinozellulären Karzinomen entspricht den Ergebnissen von ErbB2.

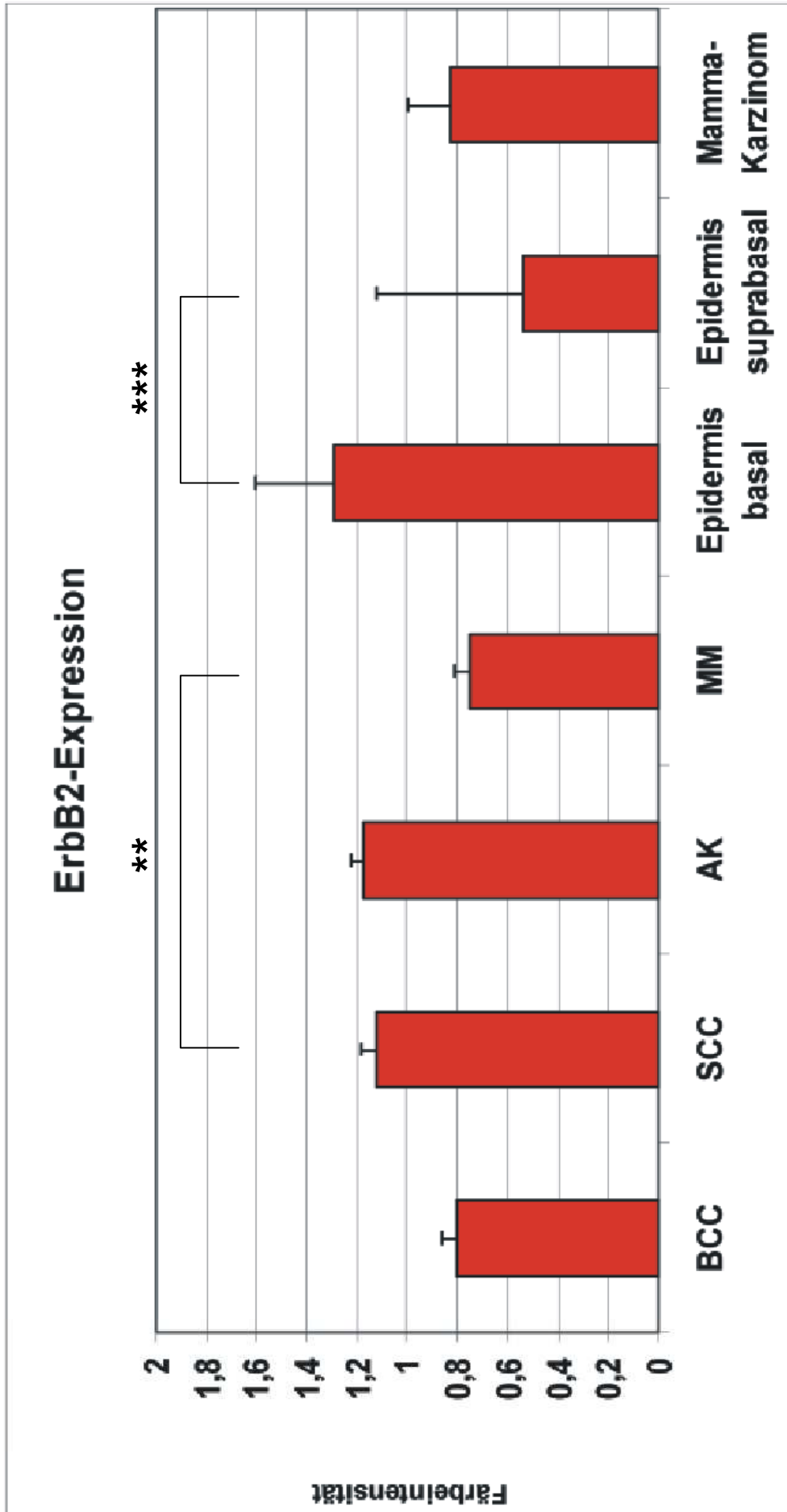
Bei den malignen Melanomen ist sowohl gegenüber normaler Epidermis und ihren Tumoren, als auch gegenüber dem Mamma-Karzinom die niedrigste Expressionsrate zu verzeichnen.

## ErbB4:

Bei der ErbB4 Darstellung fällt bei allen Fällen eine ungewöhnlich hohe Farbintensität auf. Normale Epidermis, die epidermalen Tumoren und das Mamma-Karzinom unterscheiden sich nur durch geringe Schwankungen ihrer Färbeintensitäten, während maligne Melanome wiederum deutlich darunter liegen.

Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Grafiken verdeutlicht.

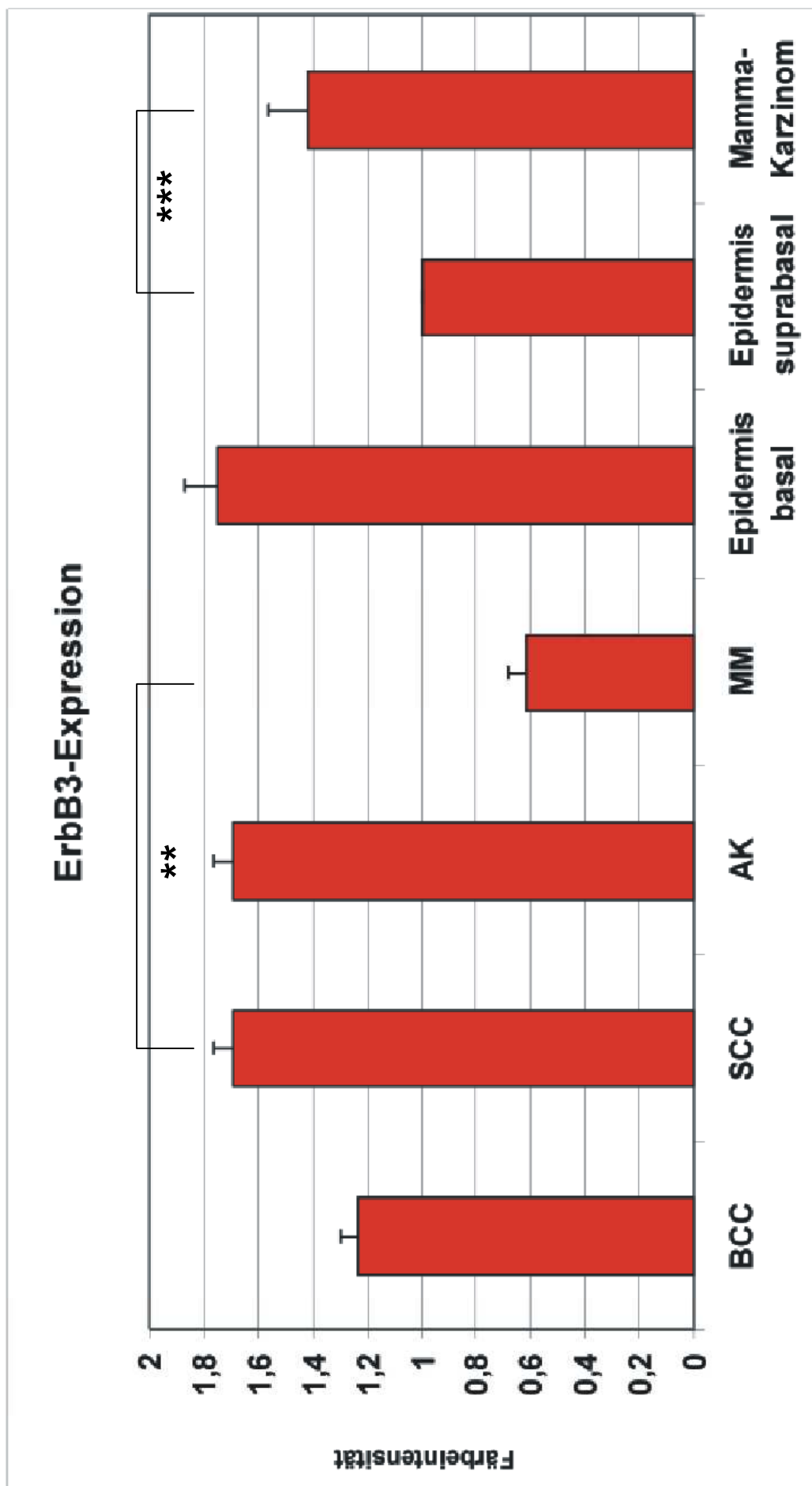
Grafik 1: Zytoplasmatische Färbeintensität von ErbB2  
Mann - Whitey U Test \*\* = p ,000; \*\*\* = ,002



Bei aktinischen Keratosen (AK), spinozellulären Karzinomen (SCC) und normalen epidermalen Zellen des Stratum basale zeigt sich die stärkste Färbeintensität. Sowohl bei Basalzellkarzinomen (BCC), normalen suprabasal gelegenen epidermalen Zellen als auch bei malignen Melanomen (MM) ist die schwächste Färbeintensität bei ErbB2 festzustellen.

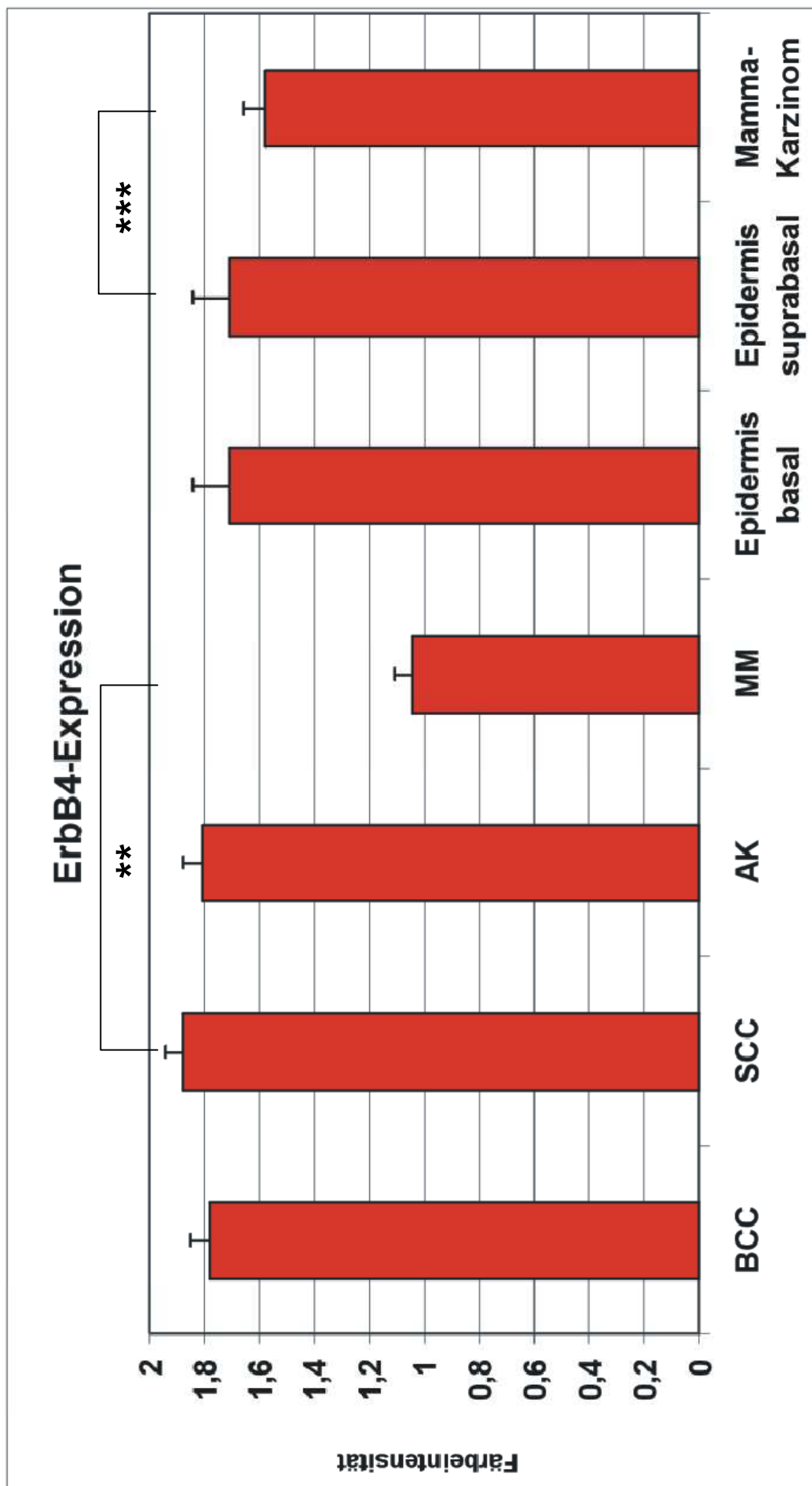


Grafik 2: Zytoplasmatische Färbeintensität von ErbB3  
 Mann - Whitey U Test \*\* = p ,000; \*\*\* = ,004



Moderate bis starke Färbeintensität bei spinozellulären Karzinomen (SCC), aktinischen Keratosen (AK) und normalen Epidermiszellen des Stratum basale. Schwache Färbeintensität beim malignen Melanom (MM).

Grafik 3: Zytoplasmatische Färbeintensität von ErbB4  
Mann - Whitey U Test \*\* = p ,000; \*\*\* = ,001



Moderate bis starke Färbeintensität bei den epidermalen Läsionen (BCC, SCC, AK, normale Epidermis). Die schwächste

Färbeintensität zeigen das malignen Melanom (MM) und Mamma-Karzinom.

## 5. Diskussion

### 5.1. Bewertung der zytoplasmatischen Reaktion

Die EGF-Rezeptoren 1-4 als essentielle transmembranöse Zellproteine können auch immunhistochemisch dargestellt werden. Bei diesen Untersuchungen werden mono- und polyklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren eingesetzt und membranöse und/oder zytoplasmatische Färbemuster beobachtet. Die Auswertung der Färbeprodukte erfolgt gemäß den Kriterien des Dako-Hercept-Testes<sup>®</sup>. Dieser Test wurde für das ErbB2 bei invasiven duktalem Mamma-Karzinomen entwickelt und bezieht sich ausschließlich auf das membranöse Färbeprodukt als optionale Basis für eine Antikörper-gestützte Therapie. Dem immunhistochemischen Befund einer ErbB2 Überexpression wird der Nachweis einer Gen-Amplifikation, die bei circa 90% der Mamma-Karzinome vorliegt, zur Seite gestellt (Böcker 2006, Kallioniemi et al 1992, Nassiri et al. 1999, Seelig 1999, Ratcliffe et al. 1997).

Die bei den verschiedenen Malignomen vielfach beobachtete alleinige, simultane oder sukzedane zytoplasmatische Reaktion ist ursächlich nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (DiGiovanna 1999, Shiraki et al. 2005, Tapia et al. 2007, Zschiesche et al. 1994).

Auch für das ErbB1 liegen unterschiedliche immunhistochemische Ergebnisse vor. So wird bei endokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes sowie endokrinen und duktalem Adenokarzinomen des Pankreas eine Expression des ErbB1 vornehmlich als zytoplasmatisches Reaktionsprodukt erfaßt (Dancer et al. 2006, Papouchado et al. 2005). Bei oralen und analen Plattenepithelkarzinomen dagegen stellt sich ErbB1 mit einem membranösen und zytoplasmatischen Färbeprodukt dar (Alvarez et al. 2006, Valdez et al. 2006, Shiraki et al. 2005). Feinmesser et al. beschreiben eine

überwiegend membranöse Darstellung des ErbB3 in Nävuszellnävi gegenüber einer zytoplasmatischen Positionierung des Rezeptors in malignen Melanomen. Epithelialen Malignomen scheint möglicherweise ein anderes Expressionsmuster der EGF-Rezeptoren zu eigen zu sein als mesenchymalen (Feinmesser et al. 2007).

Die differierenden Ergebnisse der immunhistochemischen EGF-Rezeptoren-Bestimmungen, insbesondere die Färbeprodukte im Zytoplasma, werden zum Teil als unspezifische Kreuz- oder Backgroundreaktion verstanden, obwohl eine biochemische Analyse und Identifikation der Reaktionsprodukte nicht durchgeführt wurden. Fixativ, Fixierungsdauer, Art und Konzentration der eingesetzten Antikörper sowie die Sekundärreagenzien können immunhistochemische Untersuchungen mit der Folge falsch-positiver bzw. falsch-negativer Ergebnisse beeinflussen (Buckley et al. 2006, Gown et al. 2004). Qualitative und quantitative Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptorensystem und zytoplasmatischen Glykoproteinen (z. B. MUC4), Integrinen, Phosphatasen (z. B. PTEN) sowie Veränderungen im intrazellulären Signalnetzwerk mit seinen Adaptorproteinen (z. B. SH2 oder PTB) sind in der Tumorigenese bekannt und mögen immunhistochemische Rezeptordarstellungen beeinträchtigen (Funes et al. 2006, Brockhoff 2006). Neben der direkten Interaktion mit den oben genannten modulierenden Faktoren werden auch Mutationen bzw. Epitope sowohl der Rezeptoren als auch der Liganden diskutiert. Schließlich könnte die zytoplasmatische Reaktion durch eine verstärkte lysosomale Internalisierung und Degradierung der Rezeptor-Liganden-Komplexe mit einer konsekutiven Transportblockade der Rezeptoren vom Zytoplasma zu den Zellmembranen bedingt sein.

Ein mitochondriales 155-kDa-Protein wurde als zytoplasmatisches Reaktionsprodukt identifiziert, wenn Antikörper gegen das Karboxylende des ErbB2 verwendet wurden (DiGiovanna 1999, De Potter et al. 2001). Taylor et al. hingegen ordnen das

zytoplasmatische Reaktionsmuster beim ErbB2 dem Fehlen der entsprechenden mRNA zu (Taylor et al. 1998).

Die Bewertung der positiven zytoplasmatischen Färbung bei normalen und tumorösen Zellen, wie sie auch in den vorgetragenen eigenen Untersuchungen beschrieben wurde, ist somit nicht abgeschlossen. Welche Faktoren oder Mechanismen ihr zugrunde liegen ist im immunhistochemischen Verfahren nicht zu klären. Erst eine exakte Identifizierung und Funktionsanalyse der komplexen zellulären Strukturen mit Verständnis ihrer vielschichtigen Wechselwirkungen werden eine sichere Beurteilung der zytoplasmatischen Färbereaktionen möglich machen.

### 5.2. EGF-Rezeptoren in normaler Epidermis

Wie in vielen anderen Organen werden auch in der menschlichen Haut Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Wachstum, aber auch Apoptose, Migration und Adhäsion durch das komplexe System aus diversen Wachstumsfaktoren, EGF-Rezeptoren und zytoplasmatischen Signalkaskaden gesteuert und kontrolliert. In der Epidermis wurden durch immunhistochemische und molekularanalytische Untersuchungen die EGF-Rezeptoren 1 – 4 dargestellt (Stoll et al. 2001).

ErbB1 und seine Liganden EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin sind für die Proliferation, Differenzierung und das Wachstum der Keratinozyten von essentieller Bedeutung (Downing et al. 1997, Mimeault et al. 2004). Die Wachstumsfaktoren werden von den Keratinozyten produziert und sezerniert. Sie wirken als autokrine Moleküle (Klapper et al. 2000, Yarden 2001). Den Wachstumsfaktoren wird darüber hinaus die Fähigkeit zugeschrieben, über eine Cross-Induktion sich wechselseitig zu beeinflussen. So erhöht das Epiregulin die Expression von HB-EGF-mRNA, AR-mRNA und TGF- $\alpha$ -mRNA um das 2,9- bis 5,6-fache. Andererseits folgt einem Stimulus durch EGF oder HB-EGF eine vermehrte

Produktion von Epiregulin-mRNA. Dieses Wechselspiel der Liganden und ihrer mRNA, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Maximum ihrer Expression erreichen, ist als Beleg unterschiedlicher biologischer Funktionen der Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung der Keratinozyten gedeutet worden.

Den in Keratinozyten nachgewiesenen TGF- $\beta$  1 und -2 wird ein wachstumsinhibitorischer Einfluß auf Transkriptionsebene zugeordnet (Hashimoto 2000). ErbB1 kann immunhistochemisch an Kryostatschnitten in allen Epidermisschichten mit Betonung der membranösen und einer schwächeren zytoplasmatischen Expression nachgewiesen werden (Stoll et al. 2001). Die Intensität der Farbreaktionen nimmt in adulter Epidermis vom Stratum basale und Stratum corneum kontinuierlich ab (Nanney et al. 1990). Einem Verlust des ErbB1 folgen in der Haut nachhaltige Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen (Hansen et al. 2000).

Obwohl für ErbB2 ein spezifischer Ligand, somit ein ihm zuzuordnender Wachstumsfaktor, nicht bekannt ist, ist er für die normale Entwicklung der menschlichen Epidermis unverzichtbar (Hashimoto 2000). Es ist gleichzeitig und parallel mit dem ErbB1 in den gleichen Zellen vorhanden. Seine Bedeutung mag in seiner Fähigkeit liegen, mit ErbB1 zu heterodimerisieren und so die Wirkung der ErbB1-Liganden-Komplexe zu steigern (Xie et al. 1998). Immunhistochemisch soll ErbB2 in der basalen Epidermis ein diffuses zytoplasmatisches Reaktionsprodukt haben, während in suprabasalen Schichten eine submembranöse Konzentration vorherrscht (Lebeau et al. 2001, Stoll et al. 2001). Die eigenen Untersuchungen bestätigen das zytoplasmatische Färbemuster im Stratum basale und suprabasale.

ErbB3, das eine defekte Tyrosinkinase aufweist, hat Ligandenbindungsstellen für die Neureguline 1 und 2. Er bildet in der Epidermis Heterodimere mit ErbB1 und ErbB2 (Krähn et al 2001). Insbesondere die Verbindung mit ErbB2 dürfte zu einer

Verlängerung und Intensivierung der Signalwirkungen sowie einer Verzögerung des Abbaues der Rezeptor-Ligandenkomplexe führen. Die Bedeutung dieses Rezeptors für die epidermale Entwicklung und Differenzierung ist jedoch unklar. Ähnlich wie ErbB1 scheint die Expression vom Stratum basale zu höheren Schichten abzunehmen (Kiguchi et al. 2000). ErbB3 erbrachte in den eigenen Untersuchungen ein rein zytoplasmatisches Reaktionsprodukt. Die Zellmembranen wurden nicht markiert.

ErbB4 scheint in der Epidermis entweder ganz zu fehlen oder in nur sehr geringem Maße vorzuliegen (De Potter et al. 2001, Hashimoto 2000, Krähn et al. 2001, Marikovsky et al. 1995, Stoll et al. 2001). In den eigenen Untersuchungen hingegen wurde eine intensive zytoplasmatische Farbreaktion der Stratum basale und suprabasale beobachtet (siehe 5.1.).

### 5.3. Expression von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 bei aktinischen Keratosen, spinozellulären Karzinomen und Basalzellkarzinomen

Die eigenen immunhistochemischen Untersuchungen bestätigen die physiologische Expression der Rezeptoren ErbB2 und ErbB3 in menschlicher Epidermis. Mit den eingesetzten Antikörpern wurde ausschließlich eine Reaktion im Zytoplasma erreicht. Eine Positionierung der Rezeptoren an den Zellmembranen konnte in diesem Versuchsansatz nicht verifiziert werden. Die Färbeintensitäten der ErbB2 und ErbB3 nehmen vom Stratum basale zum Stratum suprabasale deutlich ab. Überraschend ist die gleichmäßig hohe Färbeintensität des Stratum basale und suprabasale bei dem Rezeptor ErbB4.

Bei aktinischen Keratosen stellte sich im Zytoplasma ein Reaktionsprodukt dar, das im Falle des ErbB2 und ErbB3 nur gering unter dem des Stratum basale und deutlich

über dem des Stratum suprabasale lag. Die Färbeintensität des ErbB4 überschritt gering die beider Epidermisschichten.

Bei spinözellulären Karzinomen lag die Färbeintensität des ErbB2 nur wenig unter der des Stratum basale und deutlich über der des Stratum suprabasale. Beim ErbB3 sind nur unwesentliche Unterschiede zum Stratum basale zu beobachten, während ErbB3 wiederum eine höhere Färbeintensität im Vergleich mit dem Stratum suprabasale erbrachte. Spinözelluläre Karzinome scheinen eine etwas größere Menge des ErbB4 als die Epidermis zu enthalten.

Die basozellulären Karzinome erreichen weder beim ErbB2 noch dem ErbB3 die Expressionshöhe der aktinischen Keratosen und spinözellulären Karzinome. ErbB2 und ErbB3 hatten eine deutlich niedrigere Färbeintensität als das Stratum basale und eine höhere als das Stratum suprabasale. ErbB4 scheint in basozellulären Karzinomen in etwas größerer Menge vorzuliegen als in normaler Epidermis.

#### 5.4. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Daten aus der Literatur

Bei der Entstehung von epidermalen Präkanzerosen und Karzinomen ist eine Störung des komplexen Systemes aus EGF-Rezeptoren und deren Liganden sowie der vielschichtigen intrazellulären Signalkaskaden anzunehmen. Die Einbeziehung der EGF-Rezeptorenfamilie kann sich auch in einer erhöhten Expression eines oder mehrerer ihrer Mitglieder ausdrücken, wie es beispielhaft für ErbB1 und ErbB2 bei invasiven ductalen Mammakarzinomen aufgezeigt wurde (Böcker 2006). Eine Veränderung des Rezeptorenbestandes im Rahmen der Kanzerogenese –sei es durch eine Gen-Amplifizierung, eine Beeinflussung der Transkriptionsprozesse, Mutationen der EGF-Rezeptoren selbst oder ihrer zytoplasmatischen Stoffwechselabläufe mit Alteration der Abbau- und/oder Recyclingraten- könnte sich in immunhistochemischen Reaktionsprodukten niederschlagen, die von der Norm



abweichen. Es ist danach nicht auszuschließen, daß mit der Immunhistochemie internalisierte Rezeptoren-Liganden-Komplexe oder Rezeptorenfragmente erfaßt werden, auch wenn die heute zur Verfügung stehenden Antikörper sich primär oder ausschließlich gegen die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren richten und somit nur membranöse Reaktionsprodukte wegen ihrer Relevanz für Prognose und Therapie bewertet werden. Wenn schon in normaler Epidermis z. B. ErbB1 immunhistochemisch simultan in der Zellmembran und im Zytoplasma dargestellt werden kann, bzw. ErbB2 durch seine Verlagerung vom Zytoplasma zur Zellmembran vom Stratum basale zum Stratum suprabasale gekennzeichnet ist, so können ungewöhnliche Färbemuster bei epidermalen Präkanzerosen und Karzinomen nicht überraschen.

Ahmed et al. , untersuchten immunhistochemisch Keratoakanthome, aktinische Keratosen, Basalzellkarzinome und spinozelluläre Karzinomen sowie menschliche Epidermis an formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Material hinsichtlich ihrer ErbB2-Expression. Sie beschrieben in 1/5 aktinischen Keratosen eine schwache, in 5/10 Basalzellkarzinomen gleichfalls eine schwache und in 14/17 spinozellulären Karzinomen eine etwas stärkere Expression des Rezeptors mit einem heterogenen Färbemuster „exclusively in the cytoplasm with or without membraneous accentuation“ (Ahmed et al. 1997). Aus den immunhistochemischen Bildern schlossen sie auf einen erhöhten Level des ErbB2, nicht jedoch auf dessen Überexpression. Die immunhistochemischen Untersuchungen an Basalzellkarzinomen und spinozellulären Karzinomen von Maguire et al. führten zu gleichartigen Ergebnissen (Maguire et al. 1989). Liu et al. erkannten dagegen bei 43 Basalzellkarzinomen und spinozellulären Karzinomen eine Reduktion bzw. einen Verlust des ErbB2-Bestandes im Vergleich mit normalen epidermalen Zellen (Liu et al. 1996). Maubec et al. bestätigten bei metastasierten spinozellulären Karzinomen

auf der Basis immunhistochemischer Untersuchungen eine nur schwache ErbB2-Markierung in 4/13 Fällen bei gleichzeitiger membranständiger Überexpression des ErbB1 (Maubec et al. 2005).

Den Untersuchungen von Stoll et al. ist zu entnehmen, daß spinozelluläre Karzinome in höherem Maße ErbB1, ErbB2, ErbB3 und in geringerem Umfang auch das ErbB4 exprimieren (Stoll et al. 2001). Bemerkenswert ist der Nachweis, daß Karzinomzellen und Keratinozyten auf einen Neuregulin-Stimulus nur mit einer geringen Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung reagieren, während die Antwort auf eine EGF-Gabe 20- bis 100-fach stärker ausfiel. Die Erklärung dieser Reaktionsmuster mag in einer geringeren Affinität des Neuregulin zum ErbB1 und dem sehr niedrigen Bestand des ErbB4 mit der Folge einer nur geringen Heterodimerisierung zwischen ErbB1 und ErbB4 liegen. Darüber hinaus ist aus der Beobachtung, daß Keratinozyten nur wenige neuregulin-sensible Heterodimere ErbB2/ErbB3 an den Zellmembranen aufweisen, der Schluß zu ziehen, daß die im Zytoplasma lokalisierten ErbB2 in Karzinomzellen nicht in der Lage sind, mit dem ErbB3 funktionstüchtige Heterodimere an den Zellmembranen zu etablieren. Aus der intrazytoplasmatischen Fixierung des ErbB2 bei Karzinomzellen und der daraus resultierenden Resistenz gegenüber Neuregulin-Stimuli könnte eine Differenzierungsblockade der Tumorzellen resultieren. Diese Beobachtungen sind mit den eigenen Ergebnisse kompatibel nach denen sich das ErbB2 sowohl in der Epidermis als auch in aktinischen Keratosen, Basalzellkarzinomen und spinozellulären Karzinomen ausschließlich intrazytoplasmatisch darstellte.

Aktinische Keratosen und spinozelluläre Karzinome ähneln hinsichtlich ihrer ErbB2-Level basalen Keratinozyten, die während der Tumorentstehung gleichsam einem Reifungsarrest unterliegen.

Bei der Entwicklung von Basalzellkarzinomen dagegen scheint im Vergleich zu aktinischen Keratosen und spinozellulären Karzinomen eine niedrigere Expression der Rezeptoren zu erfolgen, obwohl die Färbeintensität noch höher ist, als die normaler suprabasaler Zellen. Das Färbeverhalten in aktinischen Keratosen, spinozellulären Karzinomen und Basalzellkarzinomen ist nicht Ausdruck einer ErbB2-Überexpression. Nur für das ErbB1 wird bei epidermoiden Karzinomen eine Gen-Amplifizierung angetroffen (Stoll et al. 2001). Die ungewöhnliche Beobachtung einer ErbB2-Überexpression mit Gen-Amplifizierung eines einzelnen Falles eines metastasierten niedrig differenzierten kutanen Adnexkarzinomes (Nash et al. 2006) stellt die Frage, ob der Differenzierungsgrad maligner Tumoren das Expressionsprofil der Rezeptoren beeinflusst, d.h. ob mit ansteigendem histologischem Grading von 1 nach 4 die Onkoproteine vermehrt produziert werden.

Das Färbemuster des ErbB3 ist mit dem des ErbB2 vergleichbar. Wiederum wird in aktinischen Keratosen und spinozellulären Karzinomen eine deutlich positive Reaktion des Zytoplasma erzielt, die mit dem Stratum basale vergleichbar ist, jedoch unter der in suprabasalen Keratinozyten liegt. Die Basalzellkarzinome weisen gleichfalls eine höhere Expression als suprabasale Keratinozyten auf. Insgesamt liegt die Färbeintensität etwas höher als die des ErbB2. Dieses mag dem eingesetzten Antikörper zuzuschreiben sein. Gleichwohl berichten Stoll et al. im Western-Blot-Verfahren über eine substantielle Expression des Rezeptors in epidermalen Karzinomzellen (Stoll et al. 2001). Die Bedeutung dieses Heregulin-sensiblen Rezeptors mit seiner inaktiven Tyrosinkinase liegt wohl primär in seiner Fähigkeit Heterodimere insbesondere mit ErbB2 zu bilden. Dass Basalzellkarzinome und spinozelluläre Karzinome neben ErbB1 und ErbB2 vornehmlich ErbB3 exprimieren, berichten Krähn et al. nach rtPCR-Reaktion und schließen aus diesem Expressionsmuster auf einen malignen Phänotypus (Krähn et al. 2001).

Die Bedeutung der immunhistochemischen Färbereaktion beim ErbB4 ist unklar. Einerseits scheint der Rezeptor in normaler Epidermis vollständig zu fehlen oder in nur sehr geringer Menge vorzuliegen (Krähn et al. 2001, Stoll et al. 2001), andererseits wird ErbB4 in Kulturen mit humanen epidermalen Karzinomzellen in niedriger Menge nachgewiesen (Stoll et al. 2001). Die in der eigenen immunhistochemischen Untersuchungsreihe festgestellten ErbB4-Werte sind mit denen durch die Western-Blot-Methode und rtPCR-Reaktion erhobenen Daten nicht in Einklang zu bringen. Hier bringt eine biochemische Analyse des zytoplasmatischen Färbeprodukts Aufklärung. Auch müssten die eigenen Befunde mit anderen Antikörpern verglichen werden. Immunhistochemische Ergebnisse sind nicht nur von der Spezifität und Sensitivität der Antikörper, sondern auch von den angewandten Methoden (ABC, APAP, CARD) abhängig. Falsch positive Reaktionen können darüber hinaus durch endogene Peroxidasen und endogenes Biotin hervorgerufen werden.

Sollten die im eigenen Untersuchungsgut beobachteten ausschließlich zytoplasmatischen Färbereaktionen bei aktinischen Keratosen, spinozellulären Karzinomen und Basalzellkarzinomen das Reaktionsprodukt aus den Rezeptoren und den jeweiligen Antikörpern sein, belegt dies von ErbB2 und ErbB3 im Einklang mit anderen Untersuchern die Fixierung an intrazelluläre, möglicherweise lysosomale Strukturen. Dass eine Überexpression auszuschließen ist, wird durch die klinischen Erfahrungen bestätigt. Im Falle der Basalzellkarzinome beträgt die Metastasierungsrate 1:10000, entsprechend 0,1%. Bei spinozellulären Karzinomen mit einer Tumorgöße über 2 cm schwankt die Metastasierungsrate in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp, Grading, dem Entstehungsort und dem TNM-Stadium zwischen 0,5 und 19% (Patterson 2006, IARC 2006). Die Therapiestrategien der

basozellulären und spinozellulären Karzinome sind klar definiert (Garbe 2005). Eine gegen die EGF-Rezeptoren gerichtete Immuntherapie ist nicht vorgesehen.

#### 5.5. Expression von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 bei malignen Melanomen

Die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse der malignen Melanome differieren von denen der epidermalen Läsionen (BCC, SCC, AK, normale Epidermis) insofern, als alle drei Rezeptoren nur in einem geringen Umfang und deutlich niedriger als bei den epidermalen Läsionen auftreten. Diese Beobachtung bestätigt die Untersuchungsergebnisse von Feinmesser et al. , die das Expressionsmuster aller EGF-Rezeptoren an 100 primären malignen Melanomen, 27 dysplastischen Nävi und 23 morphologisch unauffälligen Nävi verglichen haben (Feinmesser et al. 2007). Danach war in den drei Tumorgruppen das ErbB1 nur in einem sehr geringen Maße vorhanden. Sowohl in unauffälligen und dysplastischen Nävi als auch bei malignen Melanomen wurde ErbB2 angetroffen, wobei bei malignen Melanomen mit hoher Mitoserate in der vertikalen Wachstumsphase eine geringere Positivität in der epidermalen gegenüber der dermalen Tumorkomponente vorlag. Unauffällige Nävi waren in höherem Maß mit ErbB3 ausgestattet als dysplastische Nävi und maligne Melanome. ErbB3 stellte sich in diesem Untersuchungsansatz bei den unauffälligen und dysplastischen Nävi membranständig, bei den malignen Melanomen jedoch vorwiegend zytoplasmatisch dar. Dieser Befund stimmt – was die malignen Melanome betrifft – mit den eigenen Ergebnissen überein, nach denen eine Besetzung der Zellmembranen mit diesem Rezeptor nicht vorlag, sondern nur ein zytoplasmatisches Färbeprodukt. Ein Unterschied der Färbeintensität zwischen der epidermalen und dermalen Tumorkomponente wurde dagegen nicht beobachtet. Das immunhistochemische ErbB4-Bild ist mit dem des ErbB3 identisch (Feinmesser et al.

2007). Auch hier also eine kräftigere Expression der unauffälligen und dysplastischen Nävi im Vergleich mit den malignen Melanomen.

Eine positive zytoplasmatische Reaktion von ErbB2, ErbB3 und ErbB4 der Melanom-Zellen ist auch in den eigenen Fällen gegeben, wenn auch in einer erheblich niedrigeren Intensität als in normaler Epidermis bzw. ihren Tumoren. Es fällt dabei wieder auf, daß die Färbeintensität des ErbB4 höher war, als bei den beiden anderen Rezeptoren. Auch Gordon et al. wiesen darauf hin, daß Melanom-Zellen nicht nur ErbB1 sondern auch ErbB2, ErbB3 und ErbB4 exprimieren (Gordon-Thomson et al. 2005). Sie beobachteten bei normalen Melanozyten eine Aktivierung der Phosphorylierung der Tyrosin-Residuen unter dem Stimulus von TGF- $\beta$  mit der Folge einer verstärkten Migration, während die Proliferationsrate unbeeinflusst blieb. Migrations- und Wachstumsrate der Melanozyten wurden durch TGF- $\alpha$  und Heregulin nicht erhöht. Bei Melanom-Zellen dagegen stellten sich unter einem TGF- $\alpha$ -Stimulus eine vermehrte Migration, bei Heregulin-Stimulus eine signifikante Erhöhung der Wachstumsrate ein. Diese Ergebnisse sind mit der Annahme von Änderungen der EGFR-Signalwege z. B. über eine veränderte Konstellation der EGF-Rezeptor-Dimerisierung vereinbar. Offensichtlich benötigt dieser Pathomechanismus nicht eine substantielle Vermehrung der Rezeptoren. Wie gering die Bedeutung des ErbB2 für die Entstehung und Progression von malignen Melanomen ist, geht auch aus den Arbeiten von Kluger und Potti hervor (Kluger et al. 2004, Potti et al. 2003). Hier konnte der Rezeptor bei primären malignen Melanomen nur in 7 % der Fälle, bei Rezidiv-Tumoren und metastasierten Melanomen in 3,6 % der Fälle erfasst werden. Die Tumoren mussten mindestens einen Breslow-Index von >2 mm aufweisen. In keinem dieser Fälle lag eine Überexpression vor. Inman und Fink-Puches kommen zu gleichen Ergebnissen (Fink-Puches et al. 2001, Inman et al. 2003). Hingegen beschreiben Bodey et al. eine Überexpression von ErbB2 und

ErbB3 bei primären und metastasierten Melanomen in 20 von 30 Fällen (Bodey et al. 1997). Bei der Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse mit einem polyklonalen Antikörper wurden jedoch andere Kriterien als beim Dako-Hercep-Test<sup>®</sup> angewendet. Bemerkenswert ist, daß ErbB2 membranständige, ErbB3 hingegen zytoplasmatische Reaktionsprodukte aufwies. Die eigenen Untersuchungsergebnisse belegen zwar die Anwesenheit der drei Rezeptoren Im Zytoplasma in geringem Maße, lassen dabei jedoch eher auf eine untergeordnete Rolle oder Herunterregulierung beim Vergleich dysplastischer Nävi zum malignem Melanom schließen. Insgesamt kann daher nicht nachgewiesen werden, daß bei malignen Melanomen eine wesentliche Expression oder gar Überexpression der Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 vorliegt. Daher ist eine Therapiestrategie –zumindest was das ErbB2 betrifft- mit monoklonalen Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, Inhibition der intrazellulären Tyrosinkinase oder antikörper-basierte Immunokonjugate derzeit nicht indiziert.

#### 5.6. Vergleich der immunhistochemischen Reaktionsmuster

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen ist es gelungen, sowohl in normaler Epidermis als auch in den epidermalen Tumoren (BCC, SCC, AK) sowie in malignen Melanomen die Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 im Zytoplasma darzustellen. In allen Untersuchungsreihen der Tumoren und der Epidermis weichen die Färbeintensitäten der BCC, SCC und AK nur unwesentlich von denen der basalen Epidermis ab und übersteigen zugleich die der MM. Dies dürfte durch die unterschiedliche Histiogenese der beiden Tumorgruppen bedingt sein. Bei malignen Melanomen sind grundsätzlich andere tumorinitiierende Zellen als bei epidermalen Läsionen bekannt. Dementsprechend werden die immunhistochemisch faßbaren

Strukturproteine der epidermalen Tumoren bei malignen Melanomen nicht angetroffen.



## 6. Zusammenfassung

In der Epidermis werden Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Apoptose wesentlich durch die EGFR-Familie kontrolliert und gesteuert. Bei nicht-neoplastischen und neoplastischen Prozessen wird eine Alteration der epidermalen Wachstumsfaktoren, der Rezeptoren und der Signaltransduktionskaskade beobachtet. In diesem komplexen System sind bisher die quantitativen Veränderungen der EGF-Rezeptoren-Expressionsmuster am häufigsten erfasst worden. Insbesondere die Überexpression des ErbB2 ist bei vielen malignen Tumoren nachgewiesen worden und wird als Ausdruck einer schlechten Prognose, einer erhöhten Rezidivrate und eines reduzierten Ansprechens auf konventionellen Tumortherapien gewertet. Zugleich eröffnet die Überexpression des ErbB2 die Möglichkeit einer spezifischen Immuntherapie.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, das Expressionsmuster des ErbB2, ErbB3 und ErbB4 in epithelialen und melanozytären Tumoren aufzuzeigen.

Die eigenen immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse belegen, daß aktinische Keratosen und spinozellulären Karzinome betr. ErbB2 und ErbB3 ein zytoplasmatisches Färbeprodukt aufweisen, das nur gering von dem basaler Epidermiszellen abweicht, jedoch deutlich niedriger ist als im Stratum suprabasale. Bei den Basalzellkarzinomen erreicht die Färbeintensität weder die der aktinischen Keratosen und spinozellulären Karzinomen noch die des Stratum basale. Sie ist jedoch höher als in der suprabasalen Epidermisschicht. Die Färbeintensität des ErbB4 ist in der Haut und den epidermalen Tumoren ungewöhnlich hoch, obwohl der Rezeptor normalerweise nur in einer geringen Konzentration auftritt. Das Färbemuster mag durch den eingesetzten Antikörper bedingt sein.

Die Färbeintensitäten der epidermalen Tumoren sind nicht Ausdruck einer Rezeptor-Überexpression. Eine gegen die Rezeptoren gerichtete Therapie ist somit nicht indiziert.

Bei den malignen Melanomen erreichen die zytoplasmatischen Färbeintensitäten aller drei Rezeptoren nur geringste Werte. Hier könnten die Rezeptoren in der Tumorigenese nur eine untergeordnete Rolle spielen und andere Mechanismen dominieren. Die heute eingesetzten neuen Medikamente haben somit keine Zielstrukturen.

**Literaturverzeichnis**

Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M (1997)  
Increased level of c-erbB-2/neu/HER-2 protein in cutaneous squamous cell carcinoma  
Br J Dermatol 136, 908-12

Alroy I and Yarden Y (1997)  
The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions  
FEBS Lett 410, 83-86

Alvarez G, Perry A, Tan BR, Wang HL (2006)  
Expression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas of the anal canal is independent of gene amplification  
Mod Pathol 19, 942-9

Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE (1995)  
Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2  
Mol Cell Biol 15, 6496-505

Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM, Luck JV, Siegel SE, Taylor CR, Kaiser HE (1997)  
Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas  
Anticancer Res 17, 1319-30

Boecker W (2006)  
Preneoplasia of the Breast: A New Conceptual Approach to Proliferative Breast  
Saunders

Britsch S, Krippeit-Drews P, Gregor M, Lang F, Drews G (1998)  
Effects of glucagon-like peptide-1 on membrane potential and ion channels of mouse pancreatic beta-cells  
Acta Physiol Scand 157, 353

Brockhoff G (2006)  
Zytomik und Rezeptorinteraktion  
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 90, 31-38

Buckley AF, Kakar S  
Comparison of Dako EGFR pharmDx kit and Zymed antibody for the assessment of EGFR status in colorectal adenocarcinoma  
Abstract from the 95<sup>th</sup> Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, Atlanta/United States of America

- Carpenter G (1987)  
Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens  
*Annu Rev Biochem* 56, 881-914
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992)  
Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy  
*Proc Natl Acad Sci USA* 15, 4285-9
- Chamberlin SG, Davies DE (1998)  
A unified model of c-erbB receptor homo- and heterodimerisation  
*Biochim Biophys Acta* 19, 223-32
- Ceresa BP, Schmid SL (2000)  
Regulation of signal transduction by endocytosis  
*Current Opinion in Cell Biology* 12, 204-210
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985)  
Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene  
*Science* 230, 1132-1139
- Dancer Y, Thibodeaux J, Moghadamfalahi M, Lowery-Nordberg M, Albores-Saavedra J (2006)  
Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and HER2 overexpression in pancreatic intraepithelial Neoplasia (PanIN) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): A comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by FISH  
Abstract from the 95<sup>th</sup> Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, Atlanta/United States of America
- De Laat SW, Boonstra J, Defize LH, Kruijer W, van der Saag PT, Tertoolen LG, van Zoelen EJ, den Hertog J (1999)  
Growth factor signalling  
*Int J Dev Biol* 43, 681-91
- De Potter CR, Quatacker J, Maertens G, Van Daele S, Pauwels C, Verhofstede C, Eechaute W, Roels H (1989a)  
The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells  
*Int J Cancer* 15, 969-74
- De Potter CR, Van Daele S, Van de Vijver MJ, Pauwels C, Maertens G, De Boever J, Vandekerckhove D, Roels H (1989b)  
The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues  
*Histopathology* 15, 351-62

- De Potter IY, Poumay Y, Squillace KA, Pittelkow MR (2001)  
Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation  
*Exp Cell Res* 10, 315-28
- DiGiovanna MP (1999)  
Clinical significance of Her2/neu Overexpression: Part I & Part II  
*Principles and Practice of Oncology* 13, 9-10
- Dougall WC, Qian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MI (1994)  
The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies  
*Oncogene* 9, 2109-2123
- Downing MT, Brigstock DR, Luquette MH, Crissman-Combs M, Besner GE (1997)  
Immunohistochemical localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in normal skin and skin cancers  
*Histochem J* 29, 735-44
- Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW (1997)  
ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice  
*Development* 12, 4999-5011
- Ferguson KM, Darling PJ, Mohan MJ, Macatee TL, Lemmon MA (2000)  
Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors  
*EMBO J* 1, 4632-43
- Feinmesser M, Veltman V, Tobar A, Morgenstern S, Gutman H, Kaganovsky E, Tzabari C, Sulkes J, Okon E (2007)  
ErbB receptor family expression in melanocytic lesions  
Abstract from the 96<sup>th</sup> Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, San Diego/United States of America
- Fink-Puches R, Pilarski P, Schmidbauer U, Kerl H, Soyer HP (2001)  
No evidence for c-erbB-2 overexpression in cutaneous melanoma  
*Anticancer Res* 21, 2793-5
- Funes M, Miller JK, Lai C, Carraway III KL, Sweeney C (2006)  
The mucin MUC4 potentiates neuregulin signaling by increasing the cell-surface population of ErbB2 and ErbB3  
*J Biol Chem* 281, 19310-19319

Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T. Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T (1986)

Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line  
Mol Cell Biol 1986, 955-8

Garbe C (2005)

Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren  
Thieme

Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G (1995)  
Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor

Nature 23, 390-4

Gordon-Thomson C, Jones J, Mason RS, Moore GP (2005)

ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells  
Melanoma Res 15, 21-8

Gown AM, Bacchi CE (2004)

Diagnostic Immunohistochemistry of solid tumors: Strategies and Solutions  
Syllabus, Short Course # 35, Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, Vancouver/Canada

Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE (1995)

Single-chain antibody-mediated intracellular retention of erbB-2 impairs neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling  
Mol Cell Biol 15, 1182-1191

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997)

ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling  
EMBO J 1, 1647-55

Gresik EW, Kasimata M, Kadoya Y, Yamashina S (1998)

The EGF system in fetal development  
Eur J Morphol 36, 92-7

Gullick WJ (1991)

Growth factors, growth factor receptors and neoplasia  
Hum Exp Toxicol 10, 398-400

Gulliford TJ, Huang GC, Ouyang X, Epstein RJ (1998)  
Reduced ability of transforming growth factor-alpha to induce EGF receptor heterodimerization and downregulation suggests a mechanism of oncogenic synergy with ErbB2  
Oncogene 15, 2219-23

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd (1994)  
Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity  
Proc Natl Acad Sci USA 91, 8132-8136

Hansen LA, Woodson RL 2nd, Holbus S, Strain K, Lo YC, Yuspa SH (2000)  
The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors  
Cancer Res 60, 3328-32

Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1999)  
Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosin kinase  
Oncogene 18, 2681-2689

Hashimoto K (2000)  
Regulation of keratinocyte function by growth factors  
J Dermatol Sci 24, 46-50

Heldin CH (1995)  
Dimerization of cell surface receptors in signal transduction  
Cell 80, 213-223

Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE (2003)  
The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation  
Proc Natl Acad Sci USA 22, 8933-8

Hynes NE and Stern DF (1994)  
The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer  
Biochim Biophys Acta 1198, 165-184

IARC (2006)  
Pathology and genetics of skin tumours (World Health Organization Classification of Tumours)  
World Health Organization 10-47

Inman JL, Kute T, White W, Pettenati M, Levine EA (2003)  
Absence of HER2 overexpression in metastatic malignant melanoma  
J Surg Oncol 84, 82-8

- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ (1999a)  
Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer  
J Clin Oncol 17, 1974-1982
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ (1999b)  
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 17, 1983-7
- Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001)  
Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer  
Hum Mol Genet 10, 657-666
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al. (1996)  
ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer  
Embo J 15, 254-256
- Kiguchi K, Bol D, Carbajal S, Beltran L, Moats S, Chan K, Jorcano J, DiGiovanni J (2000)  
Constitutive expression of erbB2 in epidermis of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and spontaneous skin tumor development  
Oncogene 31, 4243-54
- King LE Jr, Gates RE, Stoscheck CM, Nanney LB (1990)  
Epidermal growth factor/transforming growth factor alpha receptors and psoriasis  
J Invest Dermatol 95, 10-12
- Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, 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 USA 27, 4995-5000
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y (2000)  
Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors  
Adv Cancer Res 77, 25-79
- Kluger HM, DiVito K, Berger AJ, Halaban R, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL (2004)  
Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma -- a large cohort tissue microarray study  
Melanoma Res 14, 207-10



Koepfen HK, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO, Sliwkowski MX, Hillan KJ (2001)

Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey  
Histopathology 38, 96-104

Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Morimoto S (1997)

Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4  
Oncogene 4, 2841-8

Krähn G, Leiter U, Kaskel P, Udart M, Utikal J, Bezold G, Peter RU (2001)

Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer

Eur J Cancer 37, 251-9

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA (1989)

Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors

PNAS 86, 9193-9197

Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Löhrs 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 19, 354-363

Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C (1995)

Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development  
Nature 23, 394-8

Lenkferink AE, Pinkas-Kamarski R, van de Poll ML, et al. (1998)

Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosin kinases confers signalling superiority to receptor heterodimers

Embo J 17, 3385-3397

Liu B, Zhang H, Li S, Chen W, Li R (1996)

The expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 oncogenes in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of skin

Chin Med Sci J 11, 106-9

Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K (1995)

Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance

Semin Cancer Biol 6, 135-145

- Maguire HC Jr, Jaworsky C, Cohen JA, Hellman M, Weiner DB, Greene MI (1989)  
Distribution of neu (c-erbB-2) protein in human skin  
J Invest Dermatol 92, 786-90
- Mamot C, Rochlitz C (2005)  
Iressa™, Tarceva™ und Erbitux™ -Medikamente einer neuen Generation  
Schweiz Med Forum 5, 475-479
- Mamot C, Rochlitz C (2006)  
Targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR)--a new therapeutic option in oncology  
Swiss Med Wkly 7, 4-12
- Marikovsky M, Lavi S, Pinkas-Kramarski R, Karunagaran D, Liu N, Wen D, Yarden Y (1995)  
ErbB-3 mediates differential mitogenic effects of NDF/heregulin isoforms on mouse keratinocytes  
Oncogene 6, 1403-11
- Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Crickx B, Avril MF (2005)  
Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin  
Anticancer Res 25, 1205-10
- McCann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN (1990)  
c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors  
Cancer 1, 88-92
- Mendelsohn J (2004)  
EGF Receptors as a Target for Cancer therapy  
Trans Am Clin Climatol Assoc 115, 249-54
- Mimeault M, Bonenfant D, Batra SK (2004)  
New advances on the functions of epidermal growth factor receptor and ceramides in skin cell differentiation, disorders and cancers.  
Skin Pharmacol Physiol 17, 153-66
- Nanney LB, Stoscheck CM, King LE Jr, Underwood RA, Holbrook KA (1990)  
Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin.  
J Invest Dermatol 94, 742-8
- Nash JW, Ivan D, Prieto VG, Diwan AH, Calonje E, Barrett T, Sneige N, Lyle S, Lazar AJF (2006)  
Her-2/neu expression and gene amplification in malignant and metastasising skin adnexal tumors  
Abstract from the 95<sup>th</sup> Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, Atlanta/United States of America

- Nassiri M, Planas L, Meng L, Asseri L, Morales AR (1999)  
Is immunohistochemistry adequate in detecting C-erbB-2 amplification? A comparison with F.I.S.H. and northern blot  
Abstract 1077. United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, San Francisco, CA, March 20-26
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE (1998)  
ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner  
Mol Cell Biol 18, 5042-51
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000)  
The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer  
Embo J 19, 3159-3167
- Olayioye MA, Badache A, Daly JM, Hynes NE (2001)  
An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK pathway  
Exp Cell Res 1, 81-7
- Papouchado B, Erickson LA, Rohlinger AL, Hobday TJ, Erlichman C, Ames MM, Lloyd RV (2005)  
Epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in gastrointestinal carcinoids and pancreatic endocrine carcinomas  
Mod Pathol 18, 1329-35
- Patterson JW (2006)  
Nonmelanocytic Tumors of the Skin (Atlas of Tumor Pathology Series IV)  
ARP Press 27-56
- Peus D, Hamacher L, Pittelkow (1997)  
EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation  
J Invest Dermatol 109, 751-6
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996)  
Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions  
Embo J 15, 2452-67
- Pinkas-Kramarski R, Lenferink AE, Bacus SS, Lyass L, van de Poll ML, Klapper LN, Tzahar E, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y (1998)  
The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin  
Oncogene 12, 1249-58.

- Potti A, Hille R, Koch M (2003)  
Immunohistochemical determination of HER-2/neu in malignant melanoma  
*Anticancer Res* 23, 4067-9
- Plowman G, Culouscou J, Whitney G, Green J, Carlton G, Foy L, Neubauer M, Shoyab M (1993)  
Ligand-specific activation of HER4/p180erbb4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family  
*PNAS* 90, 1747-1750
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001)  
The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification  
*Endocr Relat Cancer* 8, 11-31
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ (1994)  
Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression  
*Cancer Res* 15, 2771-7
- Rajkumar T and Gullick WJ (1994)  
The type I growth factor receptors in human breast cancer  
*Breast Cancer Res Treat* 29, 3-9
- Ratcliffe N, Wells W, Wheeler K, Memoli V (1997)  
The combination of in situ hybridization and immunohistochemical analysis: an evaluation of Her2/neu expression in paraffin-embedded breast carcinomas and adjacent normal-appearing breast epithelium  
*Mod Pathol* 10, 1247-52
- Riese DJ II, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF (1995)  
The cellular Response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family  
*Mol Cell Biol* 15, 5770-5776
- Roche PC, Ingle JN (1999)  
Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody  
*J Clin Oncol* 17, 434
- Rubin I and Yarden Y (2001)  
The basic biology of HER2  
*Ann Oncol* 12 (Suppl 1), 3-8
- Seelig S (1999)  
Fluorescence in situ hybridization versus immunohistochemistry: importance of clinical outcome  
*J Clin Oncol* 17, 3690-2

- Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC, Waterman H, Wang LM, Lyass L, Alimandi M, Kuo A, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1998)  
Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes  
J Biol Chem 24, 10496-505
- Shiraki M, Odajima T, Ikeda T, Sasaki A, Satoh M, Yamaguchi A, Noguchi M, Nagai I, Hiratsuka H (2005)  
Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer.  
Mod Pathol 18, 1482-9
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989)  
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer  
Science 12, 707-12
- Stein RA, Staros JV (2000)  
Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families  
J Mol Evol 50, 397-412
- Stoll SW, Kansra S, Peshick S, Fry DW, Leopold WR, Wiesen JF, Sibia M, Zhang T, Werb Z, Derynck R, Wagner EF, Elder JT (2001)  
Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes  
Neoplasia 3, 339-50
- Sweeney C, Carraway KL III (2000)  
Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage  
Oncogene 20, 5568-73
- Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G (2007)  
Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin  
Mod Pathol 20, 192-8
- Taylor SL, Platt-Higgins A, Rudland PS, Winstanley JH, Barraclough R (1998)  
Cytoplasmic staining of c-erbB-2 is not associated with the presence of detectable c-erbB-2 mRNA in breast cancer specimens  
Int J Cancer 18, 459-63
- Têtu B, Brisson J (1994)  
Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy  
Cancer 1, 2359-65

- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996)  
A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor  
Mol Cell Biol 16, 5276-5287
- Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y (1997)  
Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signalling network  
Embo J 16, 4938-4950
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J et al. (1984)  
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells  
Nature 309, 418-425
- Valdez AM, Villalba M, Malagon HR (2006)  
Immunoexpression of E-cadherin, MRP-1/CD9 and EGFR in acantholytic squamous cell carcinomas of the head and neck. A preliminary study  
Abstract from the 95<sup>th</sup> Meeting of the Academy of Pathology of the United States and Canada, Atlanta/United States of America
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994)  
Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways  
Annu Rev Cell Biol 10, 251-337
- Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Harris AL (1989)  
Characterization of epidermal growth factor receptor in primary human non-small cell lung cancer  
Cancer Res 1, 1313-7
- Wada T, Qian XL, Greene MI (1990)  
Intermolecular association of the p185<sup>neu</sup> protein and EGF receptor modulates EGF receptor function  
Cell 61, 1339-1347
- Wang LM, Kuo A, Alimandi M, Veri MC, Lee CC, Kapoor V, Ellmore N, Chen XH, Pierce JH (1998)  
ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4  
Proc Natl Acad Sci U S A 9, 6809-14
- Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y (1998)  
Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency  
J Biol Chem 29, 3819-27

- Weiss A and Schlessinger J (1998)  
Switching signals on or off by receptor dimerization  
Cell 94, 277-280
- Xie W, Li F, Kudlow JE, Wu C (1998)  
Expression of the integrin-linked kinase (ILK) in mouse skin: loss of expression in suprabasal layers of the epidermis and up-regulation by erbB-2  
Am J Pathol 153, 367-72
- Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF (2001)  
When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer  
J Clin Oncol 19, 2334-2356
- Yarden Y (1990)  
Agonistic antibodies stimulate the kinase encoded by the neu protooncogene in living cells but the oncogenic mutant is constitutively active  
Proc Natl Acad Sci USA 87, 2569-2573
- Yarden Y (2001)  
The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities  
Eur J Cancer 37, Suppl 4:S3-8
- Zambruno G, Girolomoni G, Manca V, Segre A, Giannetti A (1990)  
Epidermal growth factor and transferrin receptor expression in human embryonic and fetal epidermal cells  
Arch Dermatol Res 544-8
- Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ (1997)  
Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB-4  
Proc Natl Acad Sci USA 94, 9562-9567
- Zschesche W, Schonborn I, Minguillon C, Spitzer E (1994)  
Significance of immunohistochemical c-erbB-2 product localization pattern for prognosis of primary human breast cancer  
Cancer Lett 15, 89-94

## *Danksagungen*

Frau Prof. Dr. med. I. Moll danke ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas der vorliegenden Dissertationsarbeit und ihre stets wohlwollende Unterstützung. Die Beschäftigung mit dieser Thematik hat mir den Zugang zur wissenschaftlichen Denk- und Arbeitsweise eröffnet und Freude an der wissenschaftlichen Arbeit bereitet.

Ich danke außerdem meiner Frau und meinen Eltern für deren Unterstützung.

Diese Dissertationsarbeit ist meinem Vater gewidmet.



## *Eidesstattliche Versicherung*

### **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.