

Aus dem Institut für Tumorbologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

**„Methodenvergleich zwischen Chromogen- und Fluoreszenz-in situ-  
Hybridisierung bei der Bestimmung der HER 2-Genamplifikation  
beim invasiven Mammakarzinom. FISH vs. CISH“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

Dissertation der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Susanne Thon

aus Marburg an der Lahn

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 11.05.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg

**Prüfungsausschuss**

der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Jänicke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>I. Fragestellung</b>	1
<b>II. Einleitung</b>	3
1. Das Mammakarzinom	3
1.1. Epidemiologie	3
1.2. Prognosefaktoren	3
1.3. Prädiktive Faktoren	5
2. HER2	6
2.1. Protoonkogen	6
2.2. Rezeptor	6
2.3. Rolle von HER2 beim Mammakarzinom	8
2.4. Prognostische und prädiktive Bedeutung	9
3. Therapie beim HER2 positiven Mammakarzinom	10
3.1. Trastuzumab	10
4. HER2 Diagnostik	12
4.1. Nachweisverfahren	12
4.2. Aktueller Stand	14
4.3. Immunhistochemie (IHC)	14
4.4. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	15
4.5. Klinische Anwendung von IHC und FISH	16
4.6. Chromogen- <i>in situ</i> -Hybridisierung (CISH)	17
<b>III. Material und Methoden</b>	19
1. Studiendesign und Patientenkollektiv	19
2. Materialien und Reagenzien	20
2.1. Verwendete Puffer und Lösungen	20
2.2. Verwendete Reagenzien für die H&E Färbung	20
2.3. Verwendete Reagenzien für FISH und CISH	21
2.4. Labormaterial und Labortechnik	21
2.5. Optische Geräte	22

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
2.6. Hard- und Software	22
2.7. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungs (FISH) –KIT	22
2.8. Chromogen- <i>in situ</i> -Hybridisierungs (CISH) –KIT	23
3. Methoden	24
3.1. Prinzip der immunhistochemischen Färbung (IHC)	24
3.1.1. Auswertung der IHC	25
3.2. Prinzip der <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	27
3.3. Prinzip der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	27
3.4. Prinzip der Chromogen- <i>in situ</i> -Hybridisierung (CISH)	28
3.5. Vorbereitung der Tumorresektate für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	30
3.6. Methode der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	31
3.7. Methode der Chromogen- <i>in situ</i> -Hybridisierung	34
4. Auswertung	37
4.1. Hämalaun&Eosin Färbung	37
4.2. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	37
4.3. Chromogen- <i>in situ</i> -Hybridisierung (CISH)	40
5. Statistische Auswertung	41
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
1. Ergebnisse der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	43
2. Ergebnisse der Chromogen- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	46
3. Untersuchung des Ploidiegrades	48
4. Ergebnisse der HER2-Immunhistochemie	49
5. Korrelation zwischen dem HER2-Status und pathomorphologischen Daten	49
5.1. Klinische und pathomorphologische Daten der Studienpatientinnen	49
5.2. HER2-Status und Tumorgroße	51
5.3. HER2-Status und Differenzierungsgrad	51
5.4. HER2-Status und Hormonrezeptorstatus	52

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
5.5.    HER2-Status und histologischer Tumortyp	52
6.    Vergleich der FISH- und CISH-Ergebnisse	53
7.    Vergleich der FISH-, CISH- und. IHC-Ergebnisse	56
7.1.    Vergleich der FISH- und IHC-Ergebnisse	56
7.2.    Vergleich der CISH- und IHC-Ergebnisse	57
<b>V.    Diskussion</b>	<b>59</b>
1.    Vor- und Nachteile der etablierten Methoden IHC und FISH	59
2.    Vor- und Nachteile der CISH-Technik	62
3.    Diskussion der eigenen Ergebnisse	66
3.1.    Anteil der HER2-positiven Tumoren im Kollektiv	66
3.2.    Korrelation von HER2 mit klinisch-pathologischen Faktoren	66
3.3.    Vergleich der Ergebnisse aus IHC und FISH	68
3.4.    Vergleich der etablierten Methoden (IHC/FISH) mit der CISH-Technik	70
3.4.1.  IHC vs. CISH	70
3.4.2.  FISH vs. CISH	72
<b>VI.    Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>VII.   Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>VIII.  Anhang</b>	<b>96</b>
1.    Abkürzungsverzeichnis	96
2.    Tabellenverzeichnis	99
3.    Abbildungsverzeichnis	100
<b>IX.    Danksagung</b>	<b>101</b>
<b>X.      Lebenslauf</b>	<b>102</b>

Meinen Eltern

## **I. Fragestellung**

Das Mammakarzinom ist weltweit die am häufigsten zum Tode führende Krebsentität der Frau. Vordringliches Ziel biomedizinischer Forschung ist es deshalb, Faktoren mit prognostischer und prädiktiver Relevanz zu identifizieren, die zu einer Verbesserung in Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms beitragen können. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Untersuchung der Expression von Genen gerichtet, die für die Entwicklung alternativer, zielgerichteter Anti-Krebs-Therapien von Bedeutung sind. Eine Amplifikation des HER2-Gens und die daraus resultierende vermehrte Expression des HER2-Rezeptors gehen beispielsweise mit einer schlechteren Prognose für Mammakarzinom-Patientinnen einher, bieten jedoch gleichzeitig die Möglichkeit einer Therapie mit dem anti-HER2-Antikörper Trastuzumab. Ergebnisse klinischer Studien belegen, dass nur Patientinnen mit einer HER2-Überexpression von der Trastuzumab-Therapie profitieren. Um die Zielgruppe der Patientinnen – es handelt sich um etwa ein Drittel aller Mammakarzinom-Patientinnen - aus der Gesamtgruppe der Betroffenen herauszufinden und damit eine Übertherapie von Patientinnen mit HER2-negativen Tumoren zu vermeiden, muss eine zuverlässige Methode zur Verfügung stehen, mit Hilfe derer in der Routinediagnostik gut reproduzierbare Ergebnisse zum HER2-Status erzielt werden können. Die derzeit etablierten Methoden zur Bestimmung des HER2-Status sind die Immunhistochemie (IHC) und die Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH). Die gegenwärtig als Goldstandard geltende FISH-Diagnostik ist an die Verfügbarkeit eines Fluoreszenzmikroskopes gebunden, und die histologische Beurteilung des Gewebes ist gegenüber der lichtmikroskopischen Auswertung erschwert. Eine bessere histomorphologische Beurteilung ist bei Anwendung der Chromogen-in situ-Hybridisierung zur Bestimmung der HER2-Genamplifikation gewährleistet. Aufgrund der geringeren Anzahl klinischer Studienergebnisse hat sich diese Methode in der Routinediagnostik bisher jedoch nicht durchgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit soll nun der Stellenwert der CISH gegenüber den etablierten Methoden - FISH und IHC – prospektiv untersucht werden. Folgende Fragen sollen dabei beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der CISH- und der FISH-Diagnostik?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen der HER2-Expression und anderen etablierten klinisch-pathologischen Tumorparametern?
3. Korrelieren die Ergebnisse sowohl der FISH als auch der CISH mit der IHC?



## **II. Einleitung**

### **1. Das Mammakarzinom**

#### **1.1. Epidemiologie**

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste maligne Tumor der Frau mit über einer Millionen Neuerkrankungen pro Jahr. (Ferlay et al., 2004). In Deutschland erkranken jährlich über 46.000 Frauen an einem Mammakarzinom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister 2002). Etwa jede 10. Frau wird irgendwann in ihrem Leben an einem Mammakarzinom erkranken (Kreienberg et al., 2002). Im Jahr 2004 verstarben 17590 Frauen an einem Mammakarzinom, was einer Rate von 17% aller durch Krebs verursachten Todesfälle bei Frauen entspricht. Damit ist Brustkrebs nach wie vor bei Frauen die am häufigsten zum Tode führende Krebsart (Statistisches Bundesamt 2006) und stellt insgesamt die fünfthäufigste Todesursache dar.

Anhand dieser epidemiologischen Daten wird die Notwendigkeit einer optimalen Diagnostik als Voraussetzung für eine optimale Therapie deutlich. Die Diagnostik besteht neben der klinischen Tastuntersuchung, der Mammographie, dem Ultraschall und verschiedenen Biopsiemethoden sowie der histopathologischen Begutachtung auch aus der Bestimmung von individuellen prädiktiven und prognostischen Faktoren.

Die Bestimmung der Prognosefaktoren erfolgt mit dem Ziel, den Krankheitsverlauf möglichst genau einschätzen zu können. Prädiktive Faktoren sagen das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorher, wobei Faktoren prognostisch und prädiktiv zugleich sein können.

## **1.2. Prognosefaktoren**

Zu den klassischen Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz zählen das Ausbreitungsstadium des Tumors (pTNM-Status), der histopathologische Typ, der Differenzierungsgrad der Zellen (Grading), die peritumorale Lymph- und Blutgefäßinvasionen, der Steroidhormonrezeptorstatus und das Alter (Sauer, 2007).

Diese Parameter sollen obligat bei jeder Patientin mit einem Mammakarzinom vor Beginn der Primärtherapie bestimmt werden (Harbeck et al. 2001, Harbeck und Thomssen, 2002).

Neben diesen klassischen Merkmalen lassen sich noch so genannte **neue** Prognosefaktoren bestimmen, deren Einfluss auf das rezidivfreie bzw. das Gesamtüberleben zum Teil noch nicht mit gleicher Evidenz belegt ist. Diese neuen Prognosefaktoren berücksichtigen morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Eigenschaften des Tumors. In der Literatur werden derzeit über 100 neue, potentiell prognostische Faktoren diskutiert. Ein neuer Prognosefaktor muss hohe Anforderungen erfüllen. Hierfür gibt es klare, international anerkannte Empfehlungen, nach denen neue Prognosefaktoren in die Klinik eingeführt werden können (Tabelle 1)

**Tabelle 1:** Kriterien für die Implementierung prognostischer Faktoren (modifiziert nach McGuire, 1991)

- 
1. Biologische Hypothese
  2. Einfache und standardisierte Nachweismethode mit Qualitätssicherung
  3. Biostatistische Planung der Evaluierungsstudien
  4. Überprüfung der Korrelation zu etablierten Faktoren
  5. Optimierte Schwellenwerte zur Unterscheidung in Niedrig- und Hochrisikogruppe
  6. Univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung der Faktoren)
  7. Unabhängige Validierung (anderes Patientenkollektiv, andere Untersucher)
  8. Klinische (Therapie-)Studie, Metaanalyse
  9. Überführung in die klinische Praxis
-

Zu den Evidenz-basierten Faktoren mit klinischem Nutzen gehören der HER2-Rezeptorstatus (human epidermal growth factor) sowie die im Tumorgewebe nachweisbare Menge an Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und seinem Inhibitor. Letztere sind an der Adhäsion, Migration, und Invasion von Tumorzellen beteiligt (Andreasen et al., 1997). Der immunzytochemische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark wurde unter dem Terminus M1i als fakultativer Faktor bereits in die TNM-Klassifikation aufgenommen (Wittekind und Wagner, 1997). Noch zum Gegenstand der Forschung gehören die Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut sowie die Charakterisierung der im Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen hinsichtlich therapierelevanter Antigene wie HER2, uPA-R, MHC Klasse I (Braun et al, 2001, Zia et al., 2001).

Zudem sollten tumorassoziierte Proteasen wie Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen oder zellkinetische Parameter wie S-Phase-Fraktion, Ki-67, Ploidie, MIB1 und PCNA derzeit außerhalb von Studien noch nicht bestimmt werden, da sich aus dem Ergebnis der Bestimmung derzeit noch keine klinischen Konsequenzen ableiten lassen (Manual, 2007).

Viel versprechend erscheint die Anwendung von Genexpressionsanalysen zur Bestimmung prognostisch und therapeutisch relevanter Genexpressionsprofile. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine bessere Vorhersage der Prognose und des Therapieansprechens mithilfe dieser Techniken möglich ist (Buyse et al., 2006; Paik et al., 2006; Foekens et al., 2006).

### **1.3. Prädiktive Faktoren**

Es gibt bislang nur drei Evidenz-basierte prädiktive Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand in der Therapieerstellung berücksichtigt werden sollten. Das sind erstens der Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus für die endokrine Therapie und zweitens der Menopausenstatus. Der dritte zu bestimmende Parameter ist der HER2-Rezeptor Status. Die Indikation zur HER2-Diagnostik ist durch die Zulassung des gegen das HER2-Onkoprotein gerichteten humanisierten

Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) gegeben (Dowsett et al., 2000; Crump et al., Mokbel et al., 2001).

Weitere prädiktive Faktoren befinden sich noch in klinischer Erprobung. Dazu gehören die Amplifikation des Topoisomerase II $\alpha$ -Gens und der Nachweis der abgespaltenen, extrazellulären Domäne des HER2-Rezeptors im Serum, bezeichnet als HER2-ECD. Mehrere Arbeiten konnten bisher zeigen, dass eine Korrelation zwischen HER2-ECD und der Amplifikation des HER2-Gens im Primärtumor und damit möglicherweise ein Einfluss auf die Prognose und das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie besteht (Hayes et al., 2001; Fornier et al., 2005).

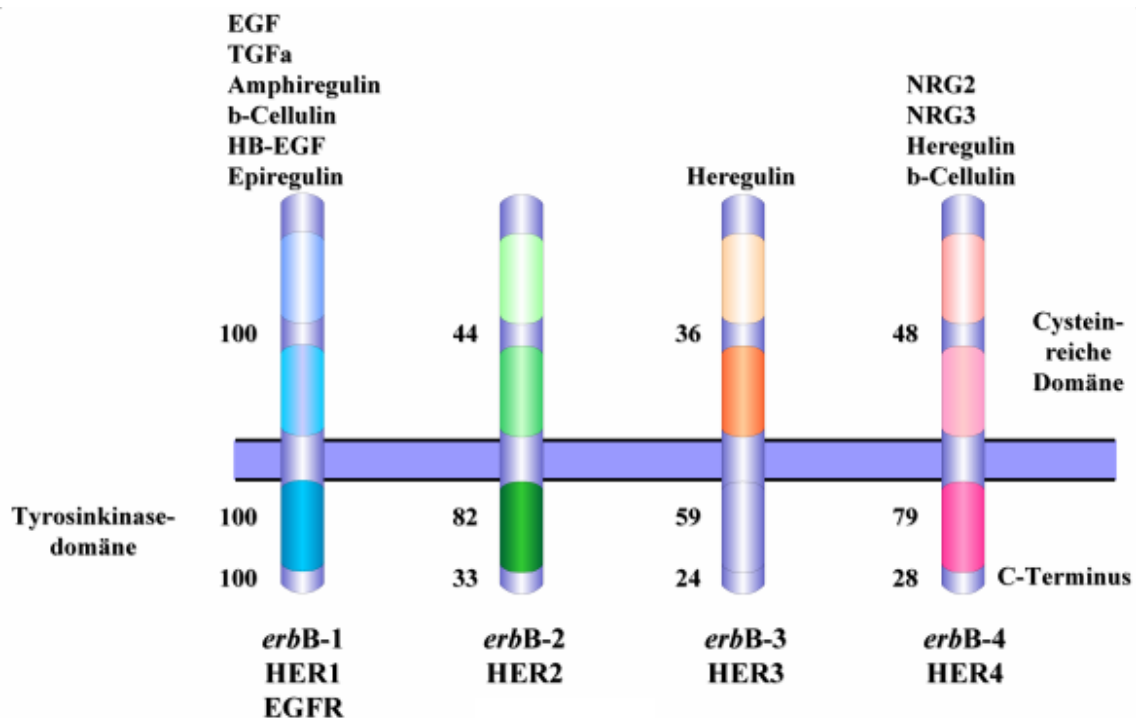
## **2. HER2**

### **2.1. Protoonkogen**

Das HER2-Protoonkogen (**human epidermal growth factor receptor 2**) liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q11.2-q21) und kodiert für einen transmembranen Wachstumsfaktor-Rezeptor vom Tyrosinkinase-Typ (Akiyama et al., 1986, Coussens et al., 1985, King et al., 1985, Popescu et al., 1989, Schechter et al., 1984, Stern et al., 1986). Die Identifikation des Gens gelang erstmals 1981 mit DNA aus chemisch induzierten Neuroblastomen bei Ratten und wurde deshalb als *neu* (i.e. Neuroblastom) bezeichnet (Shih et al., 1981). Das humane Äquivalent wurde dann 1985 von einer komplementären DNA-Bibliothek kloniert und aufgrund seiner Homologie zum humanen epidermalen „growth factor“-Rezeptor als HER2 bezeichnet (Coussens et al., 1985). Unabhängig davon wurde das Gen ebenfalls aus genomischer DNA kloniert und wegen Übereinstimmung mit dem transformierenden Gen des Erythroblastosevirus der Vögel *c-erbB2* genannt.

## 2.2. Rezeptor

Der exprimierte Rezeptor besitzt ein Molekulargewicht von 185 kD (p185). (Schechter et al., 1984). Er wird in die Klasse I der Wachstumsfaktor-Rezeptoren eingestuft, gemeinsam mit den Rezeptoren der Gene HER1 (identisch mit EGRF/epidermal growth factor), HER3 und HER4 (Lupu et al., 1995, Rajkumar and Gullick 1994, Tzahar et al., 1996). Jeder dieser Rezeptoren besitzt eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, ein transmembranöses lipophiles Segment zur Verankerung in der Zellmembran und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität sowie eine bestimmte Aminosäuresequenz am C-Terminus. (Riese und Stern, 1998; Klapper et al., 2000; Rubin und Yarden, 2001). Diese Aminosäuresequenz verfügt über spezifische Bindungsstellen für die Zielproteine der jeweiligen Tyrosinkinase. Nur hier gebundene Proteine werden durch die Tyrosinkinase phosphoryliert, so dass die Selektivität der Signaltransduktion gewährleistet ist. In der terminalen Aminosäuresequenz unterscheiden sich die vier HER-Rezeptoren am meisten voneinander (Dougall et al., 1994) (Abbildung 1)



**Abbildung 1:** Klasse I der Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Die Aufgabe der Rezeptoren besteht in der selektiven Signaltransduktion, d.h. in der spezifischen Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere und deren Weiterleitung an den Zellkern (Alroy und Yarden, 1997). Sie sind mit beteiligt an der Regulation des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Differenzierung, des Überlebens, der Apoptose und der Chemotaxis sowie der Zellmobilität und somit auch an der malignen Transformation.

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über spezifische Wachstumsfaktoren bzw. Liganden, welche Polypeptidhormone sind und jeweils eine 6-kDa-Domäne mit Homologie zu EGF enthalten. Dazu gehören Amphiregulin, Betacellulin, Epregrulin, EGF, heparin-binding EGF-like growth factor und TGF $\alpha$  für den HER1-Rezeptor und verschiedene Formen von Neuregulin (1-4) für HER3 und HER4 (Alroy und Yarden, 1997). Jedoch bindet keiner dieser Liganden direkt am HER2-Rezeptor (Klapper et al., 1999). Vielmehr bilden die Rezeptormonomere infolge der Ligandenbindung untereinander Oligodimere oder Heterodimere, wobei das HER2-Rezeptormonomer der bevorzugte Bindungspartner innerhalb der Familie ist und durch konsekutive Transphosphorylierung aktiviert wird (Graus-Porta et al., 1997).

### **2.3. Rolle von HER2 beim Mammakarzinom**

Die normale epitheliale Zelle der Brust besitzt zwei HER2-Genkopien und exprimiert zwischen 20.000 und 50.000 HER2-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. HER2 überexprimierende Tumorzellen hingegen bilden bis zu zwei Millionen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche aus (Slamon und Pegram, 2001).

Eine Überexpression des HER2-Rezeptors ist in ca. 25%-30% aller Mammakarzinome (Slamon et al., 1989), aber auch in anderen Tumoren wie dem Ovarialkarzinom in 25% (Slamon et al., 1987), dem Adenokarzinom des Kolons in 17%, des Magens in 11% sowie dem Bronchial- und

Plattenepithelkarzinom der Lunge in 28% und 11% nachweisbar (Koeppen et al., 2001). Dies legt nahe, dass das HER2-Gen bzw. der HER2-Rezeptor bei der onkogenen Transformation und der Onkogenese eine wichtige Rolle spielt.

Die Überexpression des HER2-Rezeptors hat vermutlich verschiedene Auswirkungen, die an der Onkogenese beteiligt sein können:

- Heterodimere, die den HER2-Rezeptor enthalten, haben im Vergleich zu allen anderen Oligodimer- oder Heterodimer-Kombinationen aufgrund einer langsameren Dissoziation und einer verzögerten Internalisierung des Rezeptorkomplexes eine verstärkte und verlängerte Signalübertragung (Karunakaran et al., 1996) zur Folge. Aufgrund der hohen HER2-Rezeptordichte bei Überexpression und damit dem Vorherrschen von Komplexen aus HER2 und HER3 mit hoher Signaltransduktionspotenz kommt es zu gesteigerter Proliferation, Differenzierung und Teilung der Zelle (Lohrisch und Piccart, 2001).
- Zahlreiche Signaltransduktionswege, die für die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren möglicherweise eine Rolle spielen, werden aktiviert bzw. supprimiert (Sliwkowski et al., 1999; Allres und Swanson, 2000).
- Bei einer starken Überexpression führt eine Liganden-unabhängige Rezeptoraktivierung zu einer verstärkten Zellproliferation (Pegram und Slamon, 2000).

#### **2.4. Prognostische und prädiktive Bedeutung**

Im Jahr 1987 wurde erstmals von Slamon und Mitarbeitern die prognostische Bedeutung einer HER2-Überexpression in Bezug auf das Auftreten eines Rezidivs und das Gesamtüberleben beschrieben (Slamon et al, 1987). Seitdem sind viele Studien zu diesem Thema durchgeführt und in verschiedenen Übersichtsarbeiten vorgestellt worden. Insgesamt gilt heute der Zusammenhang zwischen einer ungünstigen Prognose und der HER2-Genamplifikation bzw. einer Rezeptor-Überexpression als gesichert. HER2 wurde als univariabler sowie als unabhängiger

Prognosefaktor sowohl bei nodal positiven als auch bei nodal negativen Patientinnen überwiegend bestätigt (Slamon 1987, Gusterson et al., 1992, Sheshadri et al., 1993, Press et al., 1997; Revillion et al., 1998, Harbeck et al., 1999; Climent et al., 2000; Burstein et al., 2005).

Die prädiktive Bedeutung für HER2 ergibt sich vor allem aus der Möglichkeit einer adjuvanten Behandlung des Tumors mit dem rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland).

Zusätzlich spielt der HER2-Status hinsichtlich der Hormon- und Chemotherapieresistenz oder -sensitivität eine Rolle. Retrospektive Studien konnten zeigen, dass eine HER2-Überexpression mit einer Tamoxifenresistenz einhergeht (Carlomagno et al., 1996; Konecny et al., 2003). Eine kleine retrospektive Subgruppenanalyse ergab zudem, dass eine Therapie mit primären Aromatasehemmern im Vergleich mit Tamoxifen ein verbessertes Ansprechen der HER2-positiven Mammakarzinome erzielte (Ellis et al., 2001). Andere Analysen, wie die Ergebnisse der ATAC-Studie, konnten dies jedoch nicht bestätigen (Dowsett et al., 2006). Prospektive Studien oder Metaanalysen zur Validierung der prädiktiven Bedeutung von HER2 im Hinblick auf konventionelle adjuvante Therapien stehen noch aus. Jedoch scheinen bei einer HER2-Überexpression Anthrazyklin- und Taxan-haltige Therapien wirksamer zu sein als eine CMF-Therapie (Pritchard et al., 2006; Piccart et al., 2001; Hayes und Thor, 2002).

### **3. Therapie beim HER2-positiven Mammakarzinom**

#### **3.1. Trastuzumab**

Trastuzumab ist ein gentechnisch hergestellter zu 95% humanisierter monoklonaler Antikörper vom IgG1-kappa-Typ, der nur zu 5% murine Anteile in der Antigen-bindenden Region enthält (Shepard et al., 1991; Carter et al., 1992). Durch die Rekombination ergibt sich einerseits eine geringere Gefahr allergischer Reaktionen, andererseits ein erhöhtes Potential für die Rekrutierung



von Mechanismen der Immunabwehr. Trastuzumab bindet mit hoher Affinität und Spezifität an das HER2-Onkoprotein und hemmt die Signalübertragung vom Rezeptor zum Zellkern und damit die Proliferation und Differenzierung aller HER2-Rezeptor- exprimierenden Zellen (Shak 1999; Baselga et al., 1998). Zudem führt Trastuzumab zu einer Aktivierung der zellulären Toxizität und einer Angiogenesehemmung (Slamon et al., 1987, Shepard et al., 1991, Pegram et al., 1997, Izumi et al., 2002). Seit August 2000 ist Trastuzumab im metastasierten Stadium als Monotherapie und in Kombination mit einer Chemotherapie in Deutschland zugelassen. Seit 2005 wird es in den Leitlinien der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.) bei HER2-positiven Patientinnen auch für die adjuvante Therapie empfohlen ([www.ago-online.org](http://www.ago-online.org)). Drei neue, auf dem ASCO 2005 vorgestellte Studien (die HERA-Studie [Herceptin Adjuvant-Studie], die NSABP-B 31-Studie [National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Trial] und die NCCTG-9831-Studie [North Central Cancer Treatment Group-Studie]) weisen auf den Vorteil (Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens) einer adjuvanten Therapie mit Trastuzumab hin, so dass einer Zulassung durch die europäische Zulassungsbehörde EMEA (European Medicines Agency) im April 2006 auch für die adjuvante Therapie des nicht metastasierten Mamakarzinoms stattgegeben wurde.

Seitdem gehört die Antikörpertherapie bei HER2-positiven Patientinnen zum Standard. Sie schließt sich der Operation, Chemotherapie und Bestrahlung an, kann aber auch gleichzeitig mit der primären Chemotherapie durchgeführt werden. In der metastasierten Situation wird die Trastuzumabtherapie überwiegend mit einem Chemotherapeutikum kombiniert, derzeit meist mit den Taxanen ‚Paclitaxel‘ oder ‚Docetaxel‘. Auch in der neoadjuvanten Therapie wird Trastuzumab nach den Leitlinien der AGO 2007 in Phase III- Studien als von Vorteil bewertet. Ein „Off-Label Use“ ist möglich.

Als hauptsächliche Nebenwirkungen des Antikörpers steht, abgesehen von milden infusionsbedingten Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Erbrechen, Übelkeit oder

Kopfschmerzen, die Kardiotoxizität im Vordergrund (Hayes und Picard, 2006). Bei ca. 5% - 15% der Patientinnen entwickelt sich unter Therapie innerhalb von drei Jahren eine kardiale Dysfunktion. In 1-4% der Fälle kommt es zu schwerwiegenden kardialen Symptomen bis hin zum Herzversagen (Tan-Chiu et al., 2005; Perez et al., 2005; Geyer et al., 2006). Als wichtigste Kontraindikation ist dementsprechend die Ruhedyspnoe als Zeichen einer Herzinsuffizienz zu nennen (AGO, 2007). Weitere gesicherte Risikofaktoren für die Therapie mit Trastuzumab sind die simultane Behandlung mit Doxorubicin und ein Alter von >60 Jahre. Außerdem gelten Vorbehandlungen mit Anthrazyklinen, vorausgegangene Bestrahlungen der Brustwand, Belastungsdyspnoe, Hypertonie, koronare Herzkrankheit und hämodynamisch wirksame Klappenfehler laut Leitlinien der AGO 2007 als ungünstig.

#### **4. HER2-Diagnostik**

##### **4.1. Nachweisverfahren**

Über 90% der Rezeptor-überexprimierenden Mammakarzinome weisen eine Genamplifikation auf (Slamon et al., 1989; Pauletti et al., 1996; Kallioniemi et al., 1992). Jedoch kann eine Überexpression selten auch ohne bestehende Genamplifikation nachgewiesen werden, wobei dies vermutlich auf eine erhöhte Aktivierung der Transkription (Pauletti et al., 1996) oder auf einen verminderten Abbau der mRNA zurückzuführen ist (Kallioniemi et al., 1992; Pauletti et al., 1996). Kann jedoch keine Überexpression nachgewiesen werden, ist eine Genamplifikation äußerst selten. In den nicht übereinstimmenden Fällen liefert nach gegenwärtigem Stand der Forschung der Nachweis der Genamplifikation jedoch die prognostisch wichtigere Information (Pauletti et al., 2000).

Für einen Nachweis auf Gen-, mRNA- oder Proteinebene stehen in der HER2-Diagnostik unterschiedliche Methoden zur Verfügung (Harbeck et al., 1999, Lebeau und Löhrs, 2001; Yamauchi et al., 2001).

## **Tabelle 2:** Nachweisverfahren für HER2

### Bestimmung auf Genebene:

- Slot-Blot-Technik (Borg et al., 1990)
- Southern-Blot-Technik (Slamon et al., 1987)
- PCR (O'Malley et al., 2001)
- FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) (Kallioniemi et al., 1992)
- CISH (Chromogen-*in situ*-Hybridisierung) (Tanner et al., 2000)

### Bestimmung auf mRNA- Ebene:

- Northern Blot (Press et al., 1993)
- Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

### Bestimmung auf Proteinebene:

- Western Blot (Molina et al., 1992; Press et al., 1993)
- IHC (Immunhistochemie) (van de Vijver et al., 1988)
- ELISA zur HER2-ECD Bestimmung im Serum (Hayes et al., 2001; Fornier et al., 2005)

Die Blotting-Verfahren spielen heute eine geringe Rolle, da sie viel Gewebe benötigen und zudem Frischmaterial erfordern (Hoang et al., 2000). Die Bestimmung des abgespaltenen, extrazellulären Anteils des HER2-Rezeptors (HER2-ECD) im Patientenserum ist bislang noch von ungeklärter Signifikanz auf das Therapieansprechen in der Antikörpertherapie und daher in der Routinediagnostik noch ohne Bedeutung (Carney et al., 2007). Jedoch konnten verschiedene Studien beim metastasierten Mammakarzinom eine starke Übereinstimmung zwischen einem erhöhten Serum HER2-ECD und positiven IHC- und FISH-Ergebnissen der Primärtumore nachweisen (Müller et al., 2004; Kong et al., 2006). Bei metastasierten Patientinnen scheint ein

erhöhtes Serum HER2-ECD mit einem verkürztem Gesamtüberleben korreliert zu sein (Müller et al., 2004).

Zudem stellt HER2-ECD als Surrogatmarker für das Tumolvolumen aus klinischer Sicht eine interessante Zukunftsperspektive dar. Die Effektivität adjuvanter Therapien bzw. das Auftreten von Rezidiven könnten mit dieser Technik frühzeitig festgestellt werden (Noack et al., 2003).

#### **4.2. Aktueller Stand**

Indikation und Nebenwirkungen der Therapie mit Trastuzumab erfordern eine genaue Diagnostik des HER2-Status.

Derzeit haben sich vor allem zwei Methoden in der HER2-Routinediagnostik des invasiven Mammakarzinom durchgesetzt: 1. Die immunhistochemische Färbung (IHC), die mit der Darstellung einer Rezeptor-Überexpression gleichzeitig die Zielstruktur von Trastuzumab nachweist (Jacobs et al., 1999; Lebeau et al., 2001) und 2. die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), die eine Amplifikation auf Genebene aufzeigt, welche die Ursache einer Rezeptorüberexpression darstellt.

#### **4.3. Immunhistochemie (IHC)**

Für die Durchführung der IHC stehen verschiedene Assays zur Auswahl, bei denen monoklonale oder polyklonale Antikörper verwendet werden, die gegen das HER2-Protein gerichtet sind. Der bei der IHC entstehende Antigen-Antikörper Komplex kann mittels Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis der Farbreaktion wird über einen vierstufigen, qualitativen Score von 0 bis 3+ ausgedrückt. Lassen sich weniger als 10% der Zellen anfärben, ist das Ergebnis negativ, entsprechend einem IHC-Score von 0. Auch ein IHC-Score von 1+ gilt noch als negativ, d.h. eine Behandlung mit Trastuzumab ist ohne Effekt auf den Tumor. Wurde die Zellmembran

in mehr als 10% eingefärbt und reagieren die Zellen mit einer starken Farbintensität, erhält das Ergebnis den höchsten IHC-Score: 3+ und ist damit stark positiv (Cobleigh et al., 1999; Slamon et al., 2001). Wenn ein ICH-Score von 3+ nachgewiesen wird, profitieren die Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit von der Trastuzumabtherapie (Bast et al., 2001).

Nach den neuesten ASCO-Guidelines von 2007 wurde der Grenzwert für einen 3+ positiven Tumor von >10 auf >30%, da letzterer eher der Klinik entspricht (Wolff et al., 2007). IHC-Score 2+ klassifizierte Tumoren werden als fraglich amplifiziert angesehen.

#### **4.4. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die ersten Publikationen zur FISH-Technik erschienen Ende der 80er Jahre. Diese Methode stellt eine Verbindung von klassischer Chromosomenanalyse und molekularen Methoden dar (Passarge 2001). Für den HER2-Nachweis auf Genebene werden normalerweise zwei spezifische Fluoreszenz-markierte DNA-Einzelstrangsonden verwendet, welche komplementär zum HER2-Basenabschnitt auf Chromosom 17 sind und zusätzlich dessen Zentromer-Region darstellen. Nach dem Zusammenlagern (Hybridisierung) der beiden komplementären DNA-Stränge können das einzelne Gen bzw. der Genabschnitt selektiv im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Es werden also sowohl das HER2-Gen (HER2) als auch das Chromosom 17 (CEP17) identifiziert und quantifiziert. Dadurch ist eine direkte Aussage über den Ploidiegrad parallel zur Bestimmung des HER2-Status möglich.

Bei dem zur FISH-Diagnostik von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen PathVysion™ HER2-DNA Sonden Kit (Abbott/Vysis, Inc. Downers Grove, IL, USA) werden auf Chromosom 17 sowohl das HER2-Gen als auch dessen Zentromer identifiziert und quantifiziert. Ein positiver HER2-Status ist hier definiert als Quotient der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Gensignale und der durchschnittlichen Anzahl der CEP 17-Zentromersignale (HER2/CEP17 Ratio) von 2,0 oder mehr in 60 ausgezählten Interphase-Zellkernen. Ein Quotient

von kleiner 2,0 spricht gegen eine Amplifikation. Werte zwischen 1.8 und 2.2 sind jedoch als grenzwertig amplifiziert zu betrachten.

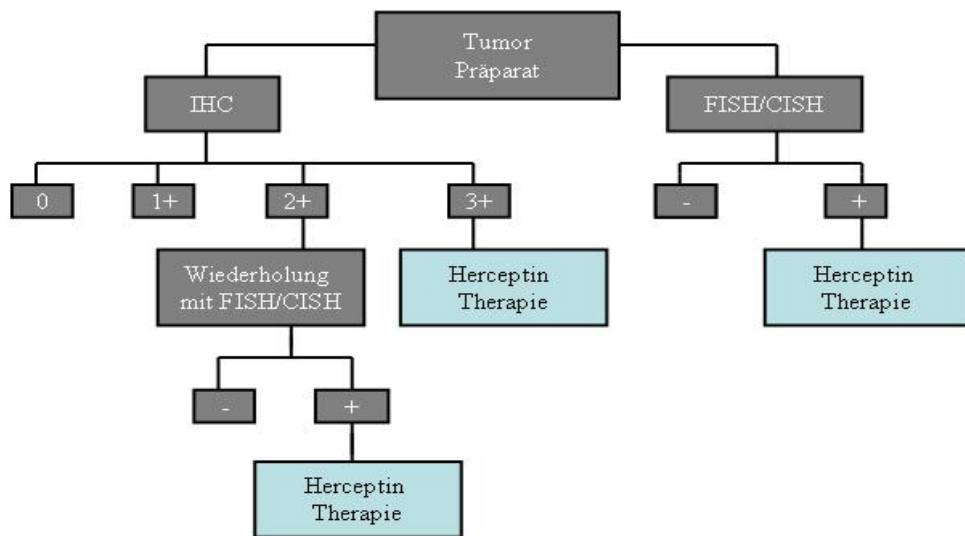
Bei anderen HER2-Testsystemen wird nur die Anzahl der HER2-spezifischen Signale pro Tumorzellkern bestimmt. Ein Durchschnittswert von  $> 6$  HER2-Signalen pro Tumorzellkern wird hierbei dann als Amplifikation bezeichnet. Mehr als 4 bis zu 6 Genkopien pro Zellkern werden als fraglich amplifiziert angesehen (Dal Lago et al., 2006; Vera Roman et al., 2004).

Diese beide Verfahren, IHC und FISH, kommen einzeln und in bestimmten Fällen in Kombination zum Einsatz, wobei die FISH-Technik in mehreren Studien als Goldstandard angesehen wird und als Referenz Standard in der HER2-Bestimmung gilt (Hicks and Tubbs, 2005, Bartlett et al., 2003).

#### **4.5. Klinische Anwendung von IHC und FISH**

Internationale Leitlinien empfehlen die Anwendung eines bestimmter Algorithmus in der HER2-Testung und der sich aus ihr ergebenden Therapie (Bilous et al., 2003). Dabei wird die IHC als das zuerst anzuwendende Testverfahren empfohlen, da sie einfacher, kostengünstiger und in jedem Labor routinemäßig durchführbar ist. Bei den eindeutig negativen IHC-Scores 0 und 1+ sowie dem eindeutig positiven IHC Score 3+ sind keine weiteren Kontrollen nötig. Patientinnen mit negativem HER2-Status erhalten keine Trastuzumabtherapie, wohingegen HER2-positive Patientinnen mit Trastuzumab behandelt werden. IHC 2+ klassifizierte, also fraglich überexprimierende Tumoren benötigen dagegen eine Bestätigung der Genamplifikation mittels FISH (Yaziji et al., 2004; Bilous et al., 2003). Ein positives FISH-Ergebnis berechtigt immer zu einer Therapie mit Trastuzumab, unabhängig davon, ob FISH als Kontrolle der IHC oder als Eingangstest verwendet wurde (van de Vivjer et al., 2007). Fraglich amplifizierte FISH-Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren (Persons et al., 2006; Dal Lago et al., 2006). Es

wird empfohlen, zusätzliche Zellen auszuzählen und die FISH zu wiederholen oder, falls noch nicht vorhanden, eine IHC durchzuführen. Da Patientinnen mit einem Quotienten von 2.0 -2.2



früher als HER2-positiv galten und neuere Daten einen Therapie-Ausschluss nicht unterstützen, erhalten diese Patientinnen weiterhin eine Trastuzumabtherapie (Wolff et al., 2007). (Abbildung 2)

**Abbildung 2:** HER2 Test-Algorithmus (modifiziert nach Bilous et al., 2003)

#### **4.6. Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH)**

Die Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH) wurde unlängst als Alternative zur IHC und FISH in der Diagnostik von HER2 eingeführt (Tanner et al., 2000). Derzeit ist die CISH-Technik in der

Routinediagnostik allerdings noch nicht zugelassen. Jedoch wird sie in einer Vielzahl von Studien als gleichwertig gegenüber der IHC- und FISH-Technik angesehen, da sie vergleichbar gute Ergebnisse aufweist und sogar signifikante Vorteile gegenüber der FISH-Diagnostik besitzt. (Tanner et al., 2000, Zhao et al., 2002, Dandachi et al., 2002, Arnould et al., 2003, Tubbs et al., 2003, Isola et al., 2004, van de Vijver et al., 2007).

CISH beruht wie FISH auf dem Nachweis einer Genamplifikation, verwendet jedoch anstelle eines Fluoreszenz-Farbstoffes ein Chromogen zur Sondenmarkierung. Dies macht die Auswertung der Gensignale mit einem einfachen Lichtmikroskop möglich und vereinfacht dadurch auch die Beurteilung der Tumormorphologie. Mittels Peroxidase-Reaktion werden die HER2-Gensignale als braune Punkte sichtbar.

Die CISH-Technik verwendet allerdings - anders als die FISH-Technik - keine Sonde zur Darstellung des Chromosoms 17, so dass eine direkte Aussage über eine eventuell vorhandene Polyploidie nicht möglich ist. In den Auswertungskriterien der CISH wird jedoch berücksichtigt, dass eine chromosomale Polyploidie eine erhöhte Anzahl von HER2-Signalen hervorrufen kann.

Eine endgültige Übereinkunft über den Stellenwert der CISH-Technik in der HER2-Diagnostik ist noch nicht getroffen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den Stellenwert der CISH Methodik im Vergleich zu den etablierten Verfahren der IHC und FISH zur Bestimmung des HER2-Status zu ermitteln.



### **III. Material und Methoden**

#### **1. Studiendesign und Patientenkollektiv**

Grundlage dieser prospektiven Studie bilden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebe von 100 Patientinnen mit histologisch gesichertem, primär-invasiven Mammakarzinom, welche in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und des Albertinen-Krankenhauses Hamburg zwischen August 2003 und September 2004 tumorreseziert wurden.

Entgegen der klinischen Routine wurde in dieser prospektiven Untersuchung bei allen ausgewählten Patientinnen - unabhängig vom immunhistochemischen Status - der HER2-Genamplifikationsstatus ermittelt. Der Genamplifikationsnachweis erfolgte an dem in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Primärtumormaterial. Zur Beurteilung des Amplifikationsstatus wurden die Ergebnisse der **Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH)** und **Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)** miteinander verglichen. Zusätzlich standen zur retrospektiven Validierung der CISH die Ergebnisse der **immunhistochemischen Färbung (IHC)** des Instituts für Pathologie der Universität Hamburg zur Verfügung. Folgende klinische und histo-morphologische Daten der Patientinnen wurden zudem zur Verfügung gestellt: Alter der Patientin, Zeitpunkt der Operation, histopathologische Diagnose (invasiv-duktral, invasiv-lobulär, sonstige) und pathologisches Stadium gemäß der TNM-Klassifikation mit Grading, Gesamtzahl der entfernten und Anteil der mikroskopisch befallenen Lymphknoten, Hormonrezeptorstatus sowie der Expressions-Score des Proliferationsmarkers Ki 67. Das Tumorstadium der Mammakarzinome wurde entsprechend der 6. Auflage der TNM-Klassifikation sowie das Grading nach Elston und Ellis, 1991 im Institut für Pathologie der Universität Hamburg beurteilt.

## 2. Materialien und Reagenzien

### 2.1. Verwendete Puffer und Lösungen

PBS –Puffer: auf 1000 ml, pH	90g NaCl, 14,33g Na <sup>2</sup> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 2,67g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
20 x SSC auf 1000 ml, pH 7	175,3g NaCl, 88,2g NaCitrat
1 x PBS / Tween20 auf 2000ml	200ml 10 x PBS , 5ml Tween20
0,5 SSC auf 1000ml	2,5ml 20faches SSC
3% H <sub>2</sub> O <sup>2</sup> in Methanol	20ml H <sub>2</sub> O <sup>2</sup> , 180ml Methanol
Salzsäure Ethanol 3%	25ml HCl 25% auf 1000ml Ethanol 96%

### 2.2. Verwendete Reagenzien für die H&E Färbung

Eosin G-Lösung, 0,5% wässrig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCl 1mol/L	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Alkohol vergällt 96%	Walter Cmp Gmbh & Co Kg, Kiel, Deutschland

### **2.3. Verwendete Reagenzien für FISH und CISH**

<b>MATERIAL</b>	<b>HERSTELLER</b>
Alkohol vergällt 70%,80%,96%,100%	Walter Cmp Gmbh & Co Kg, Kiel, Deutschland
p-Xylol	Fluka, Steinheim, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	J.T.Baker, Deventer, Holland
Tween20 (Polyoxyethylensorbitaumonolaurat)	Merck-Suchardt, Hohenheim, Deutschland
KH <sup>2</sup> PO <sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na <sup>2</sup> HPO <sub>4</sub> x 2H <sup>2</sup> O (di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid- Plätzchen NAOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixogum	Marabuwerke GmbH&Co, Tamm, Deutschland
Eukitt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, Ca., USA

### **2.4. Labormaterial und Labortechnik**

Deckgläschen (24x32mm 21x26mm)	Marienfeld/Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger SUPERFROST/ Plus, (75x25mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Peltier Thermal Cycler (PTC) -200	MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland
Objektträger Schnelltrockner TDO 66	Medite, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland

### **2.5. Optische Geräte**

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2imaging	Zeiss, Jena, Deutschland
--	--------------------------

10er Objektiv 63er Ölimmersionsobjektiv 100er Ölimmersionsobjektiv	
Fluoreszenzmikroskop Filtersätze Einfachbandpass-Filter DAPI Einfachbandpass-Filter Green (FITC) Einfachbandpass-Filter Orange (CY 3)	Zeiss, Jena, Deutschland - Zellkern - HER2-Genlokus - Centromer des Chromosom 17
Hochauflösende CCD-Kamera mit RGB-Farbmodus	MetaSystems, Althusenheim, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM LB 40er Vergrößerung	Leica, San Jose, USA

## **2.6. Hard- und Software**

Metacyte <i>Isis</i> FISH Imaging System	MetaSystems, Althusenheim, Deutschland
Metafer MSearch	MetaSystems, Althusenheim, Deutschland

## **2.7. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH) -KIT**

### **Direct Label Chromosome Enumeration DNA Sonden-KIT, für *in vitro* Diagnostik (Vysis,Inc.,Downers Grove, IL, USA)**

Das standardisierte KIT enthält Reagenzien für 20, 50 oder 100 Test, wobei ein Test für eine 22mm x 22mm große Zielfläche definiert ist.

I. PathVysion™ HER2 DNA Sonden-KIT (Abbott/Vysis, Inc., Downers

Grove, IL, USA) (LSI®HER2 SpectrumOrange™ / CEP® 17 SpectrumGreen™)

II. Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz

Folgende Reagenzien sind im KIT enthalten:

<b>PATHVISION™HER2 DNA SONDEN-KIT</b>	
LSI HER-2 SpectrumOrange (low copy number E. coli Vector) / (LSI = locus specific identifier)	- 190 kb große, mit SpectrumOrange direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für den Genlokus HER2 (17q11.2-q12)
CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde (E. coli Plasmid) (CEP = chromosome enumeration DNA probe)	- mit 5.4 kb SpectrumGreen direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für die alpha-Satellit-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) - blockierende DNA - vorgemischt und vordenaturiert in Hybridisierungspuffer (formamidhaltig)
DAPI Gegenfärbung	- 1000 ng/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindol - 1,4-Phenyldiamin Dihydrochlorid - Glycerin - Puffer
NP-40	- Nonylphenyl-polyethylenglykol-40
20 x SSC Salz	(SSC = sodium saline citrate)
<b>Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz</b>	
gebrauchsfertige Vorbehandlungs-Lösung	NaSCN pH 7,0
Enzym-Reagenz	Pepsin, 2500-3000 Einheiten/mg

## **2.8. Chromogen-*in situ*-Hybridisierungs (CISH) -KIT**

**Zymed SPoT-Light® HER2 CISH™ KIT, für *in vitro* Diagnostik (Zymed Laboratoire Inc., South San Francisco, CA, USA)**

Das standardisierte KIT enthält Reagenzien für 20 -25 Tests, je nach Größe der verwendeten Schnitte.

I. SPOT-Light® HER2 DNA Sonden-KIT

II. Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz

### III. Zymed CISH™ Polymer Nachweis-KIT

Folgende Reagenzien sind im KIT enthalten:

<b>SPOT-Light® HER2 DNA Sonden-KIT</b>	
gebrauchsfertige Digoxigenin markierte HER2 DNA-Sonde	200kb große, Digoxigenin markierte Doppelstrang-Sonde für den HER2-Genlocus (17q21)
<b>Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz</b>	
gebrauchsfertige Vorbehandlungs-Lösung Enzymreagenz	NaSCN, pH 7,0
<b>Zymed CISH™ Polymer Nachweis-KIT</b>	
gebrauchsfertiger CAS-Block™	Unspezifische Proteinblockierungs-Lösung
gebrauchsfertiger Maus anti-Digoxigenin Antikörper	monoklonaler Primärantikörper FITC-Schaaf anti Digoxigenin
gebrauchsfertiger polymerisierter HRP-Anti-Maus Antikörper	polymerisierter monoklonaler anti-FITC Antikörper mit Meerrettich (HRP) -Peroxidase
Reagenz D1	Substrat Puffer Konzentrat
Reagenz D2	DAB Solution Konzentrat (Diaminobenzidin)
Reagenz D3	0,6% Hydrogen Peroxidase
Histomount™ Mounting-Lösung	

## 3. Methoden

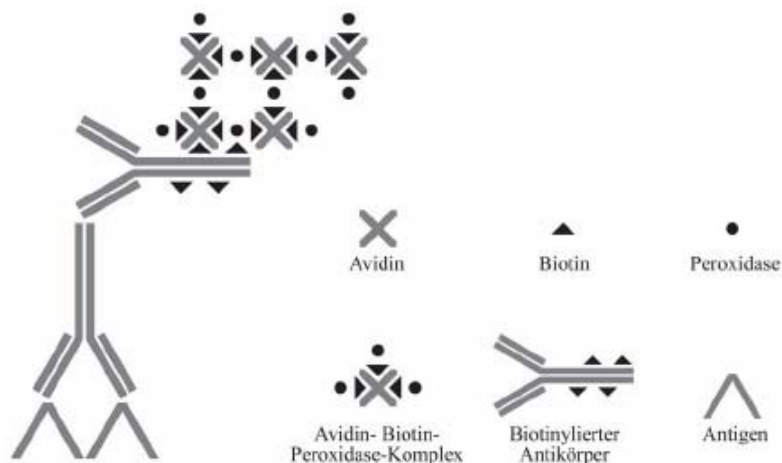
### 3.1. Prinzip der immunhistochemischen Färbung (IHC)

Die IHC-Färbung der hier verwendeten Tumore wurde im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Pathologie der Universität Hamburg durchgeführt. Dort wurde der FDA zugelassene monoklonale Maus-anti-HER2-Antikörper CB11 der Firma Novocastra (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, England) verwendet und die Färbung mit einem standardisierten Detektions-Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Angewendet wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) von Hsu et al. (1981). Dabei bindet der Primärantikörper spezifisch an das Antigen HER2. Ein mit Biotin-konjugierter Sekundärantikörper bindet sich an den Primären und das dritte Reagenz, ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, dann an den

Sekundären. Nach Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB), wird mit Hilfe des Enzyms Peroxidase eine HER2-Expression durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Diese zeigt sich durch eine Braunfärbung (Abbildung 3).

### **3.1.1. Auswertung der IHC**

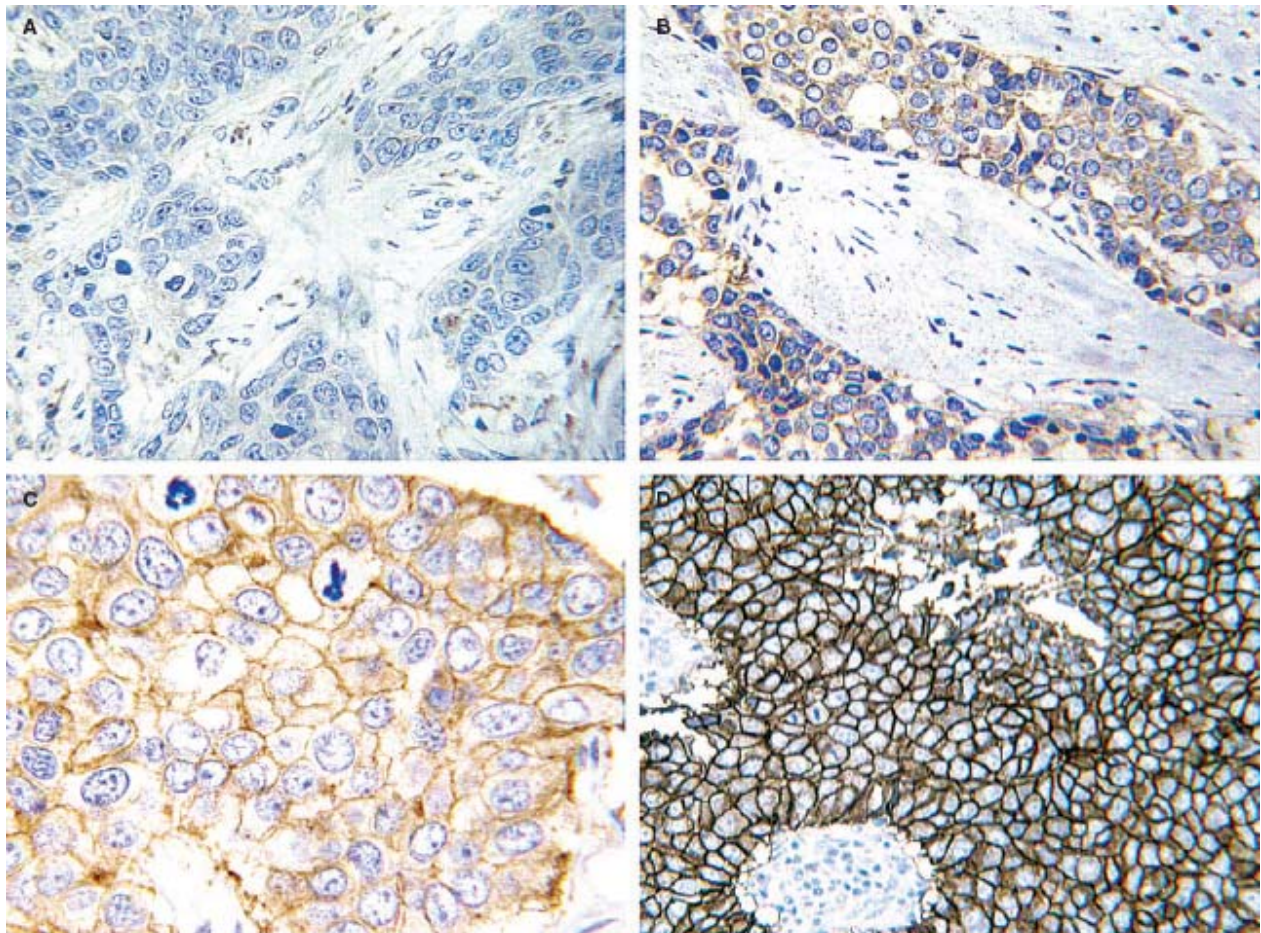
Die qualitative Auswertung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Dako, Glostrup, Dänemark) durch den Pathologen. Demnach wird zunächst das Verteilungsmuster in 3 Kategorien eingeteilt: nukleär, zytoplasmatisch und membranös, wobei für die Beurteilung des HER2-Rezeptorstatus ausschließlich das membranöse Färbemuster entscheidend ist (Press et al, 1993; Bast et al., 2001; Harris et al., 2001). Dieses wird auf Vollständigkeit sowie Intensität bewertet und die Anzahl der HER2-exprimierenden Zellen in Prozent bestimmt. Die membranöse Färbung wird als vierstufiger Score von 0 bis 3+ mitgeteilt (Tabelle 3; Abbildung 4).



**Abbildung 3:** Avidin-Biotin Komplex Methode

**Tabelle 3: DAKO-Score**

Positive Zellen	Membranfärbung	Färbeintensität	IHC-Score	HER2 Status Beurteilung
weniger als 10%	-	-	0	negativ
mehr als 10%	nicht komplett	-	1+	negativ
mehr als 10%	vollständig	schwach bis mäßig	2+	fraglich amplifiziert
mehr als 10%	vollständig	stark	3+	positiv



**Abbildung 4: (A-D): Immunhistochemische Färbung (DAKO-Score 0 - 3+)**

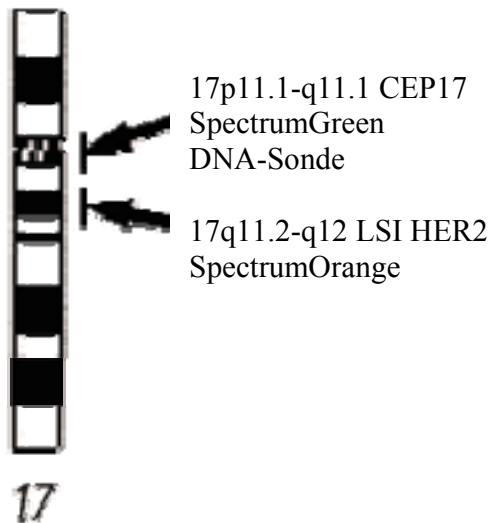


### **3.2. Prinzip der *in situ*-Hybridisierung (ISH)**

Das Prinzip der *in situ*-Hybridisierung beruht auf der Fähigkeit einsträngiger markierter Nukleinsäuresonden direkt im biologischen Präparat, also „*in situ*“, mit spezifischen Abschnitten komplementärer Nukleinsäuren zu binden (hybridisieren). Durch Denaturierung liegt die zu untersuchende DNA als Einzelstrang vor und wird damit für die Sonde frei zugänglich. Ziel-DNA und Sonde verbinden sich zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt, der so genannten Hybrid-DNA. Die *in situ*-Hybridisierung dient somit der Identifizierung von Chromosomen, Chromosomenabschnitten oder einzelnen Genen in den zu untersuchenden Gewebeproben und kann diese in ihrem morphologischen Kontext sichtbar machen. Dadurch lassen sich numerische (Aneuploidie) und strukturelle (Deletion, Translokation) Chromosomenaberrationen, sowie Amplifikationen von Genen detektieren und virale Integrationsorte lokalisieren (Hyytinen et al., 1994). Darüber hinaus wird diese Technik auch zur Genkartierung und zur Analyse der Nukleusorganisation eingesetzt (Hanke et al., 1997).

### **3.3. Prinzip der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung verwendet DNA-Sonden, die direkt oder indirekt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die Emission energiearmer, langwelliger Strahlung des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops mit unterschiedlichen Exzitationsfiltern sichtbar gemacht werden (Hanke et al., 1997; Pasternak 1997). Bei gleichzeitiger Verwendung von verschiedenen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden ist eine Mehrfach-Analyse möglich. Mit diesem Prinzip arbeitet der doppelmarkierte PathVysion™HER2 DNA Sonden-KIT, welcher in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Eine orange fluoreszierende Sonde stellt den HER2-Genlocus dar (LSI HER2 SpectrumOrange DNA-Sonde), eine grün fluoreszierende Sonde bindet an die Zentromer-Region von Chromosom17 (CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: FISH-Loci**

Es werden also das HER2-Gen sowie das Chromosom 17 identifiziert und quantifiziert. Dadurch ist eine direkte Aussage über den Ploidiegrad parallel zur quantitativen Bestimmung des HER2-Status möglich.

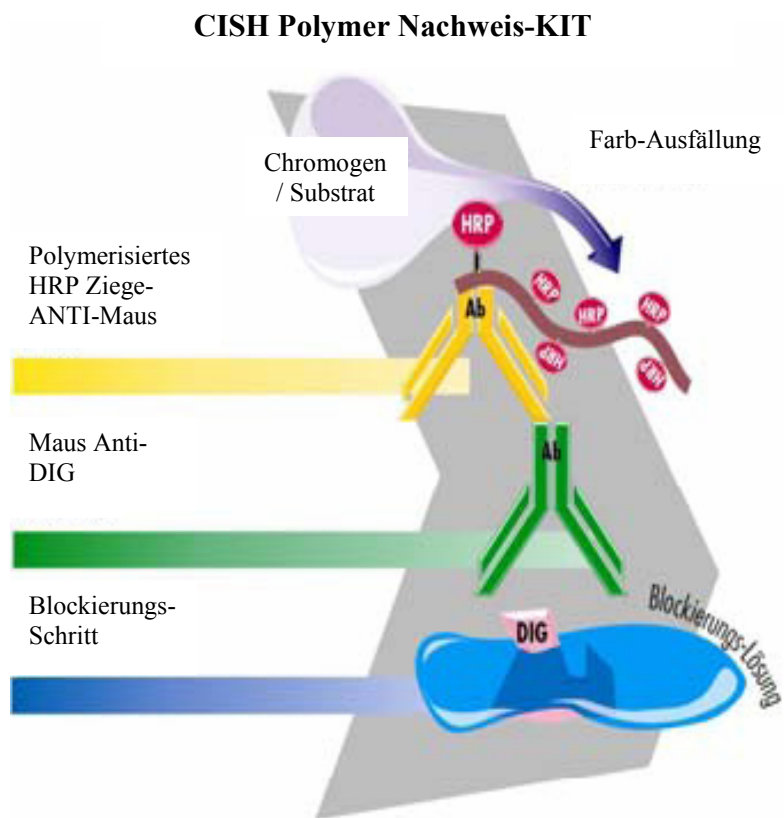
Um eine möglichst effektive Hybridisierung zu erreichen, liegt die insgesamt 190.000 Basenpaare (190 kb) umfassende LSI HER2 SpectrumOrange DNA-Sonde in etwa 500 Basenpaar-langen Fragmenten vor. Zur Gegenfärbung und Darstellung der Zellkerne dient ein blau fluoreszierender Farbstoff (DAPI), der in die DNA interkaliert.

Der PathVysion™HER2 DNA Sonden-KIT ist von der FDA zur Bestimmung der Her2-Genamplifikation beim Mammakarzinom zugelassen.

### **3.4. Prinzip der Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH)**

Die Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH) erfolgt mittels einer für den Genlokus von HER2 (17q21) spezifischen Sonde, welche mit dem pflanzlichen Steroid Digoxigenin (DIG) markiert wurde. Durch Bildung eines Hybrids aus Ziel-DNA und dazu komplementärer Sonde, kann mittels einer Immunreaktion das HER2-Gen sichtbar gemacht werden. Die Detektion erfolgt

durch einen primären, gegen Digoxigenin gerichteten Maus-Antikörper und einen sekundären Anti-Maus-Antikörper, welcher mit einem Aminosäure-Polymer gekoppelt ist. An das Aminosäure-Polymer gebundene Peroxidasen (HRP) reagieren mit dem chromogenen Einzelfarbstoff DAB (Diaminobenzidin). Dadurch werden die Gensignale lichtmikroskopisch sichtbar (Abbildung 6)



**Abbildung 6:** CISH-Methodik, Polymer Nachweis-Kit, Firma Zymed

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sonde handelt sich um die Spot-Light® HER2-DNA Sonde der Firma Zymed (Zymed Laboratoire Inc., San Francisco, USA) Sie ist eine ca. 200.000 Basenpaare (200kb) umfassende, Digoxigenin-markierte doppelsträngige HER2-DNA Sonde, welche durch die Elimination der repetitiven Sequenzen der humanen Nukleinsäuren (wie z.B. Alu und LINE-Elemente) erhalten wurde. Die Elimination basiert auf der so genannten

„subtraction probe technology“ (SPT™, Patent, Fa. Zymed). Eine Blockierung der repetitiven Sequenzen ist für diese Verfahren nicht erforderlich.

Die Digoxigenin-markierte Spot-Light® HER2-DNA Sonde der Firma Zymed kann sowohl für in-situ-Hybridisierungen an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe als auch an Metaphase- und Zellpräparationen verwendet werden. Die parallele Anwendung unterschiedlicher Hybridisierungssonden auf einem Präparat ist nicht möglich.

### **3.5. Vorbereitung der Tumorresektate für die *in situ*-Hybridisierung**

#### **1. Anfertigen der Paraffinschnitte**

Von jedem der 100 in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Tumorresektate wurden mit dem Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 2-4µm angefertigt. Um eine optimale Anhaftung der Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitte am Objektträger zu sichern, wurden speziell beschichtete Superfrost/Plus Objektträger verwendet. Je ein Schnitt wurde H&E (Hämatotoxylin und Eosin) gefärbt, um unter dem Lichtmikroskop die Lokalisation des invasiven Tumoranteils zu überprüfen und zu dokumentieren. Der zweite und dritte Schnitt wurden jeweils für die beiden in-situ-Hybridisierungen (FISH und CISH) verwendet.

#### **2. Entparaffinierung**

Vor Durchführung der *in situ*-Hybridisierungen wurden die Paraffinschnitte über Nacht (16h) bei 57°C und anschließend in Xylol für 2x10 min entparaffiniert. Zur Entfernung des Xylols wurden die Schnitte anschließend für 2x10 min in 100% Ethanol gespült, in absteigender Alkoholreihe (96%, 80%) rehydriert und danach luftgetrocknet.

## **Protokoll zur Entparaffinisierung**

1) Paraffinschnitte 2-4µm dick
Entparaffinisierung über Nacht (16h) bei 57°C
2 x 10 min waschen in Xylol, bei Raumtemperatur
2 x 10 min waschen in 100% Ethanol, bei Raumtemperatur
Absteigende Alkoholreihe (96% - 80%)

### **3.6. Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

#### **1. Fixierung**

Die Fixierung dient der Proteinstabilisierung, um Veränderungen durch die weitere Bearbeitung zu verhindern. Zur Fixierung werden die Schnitte für 10 min. in 2% Formaldehyd in Methanol bei -20°C denaturiert und anschließend 3x3 min. in PBS Puffer gewaschen.

#### **2. Hitzebehandlung**

Die Schnitte werden für 10 min. in Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz (II) bei 97°C im Wasserbad inkubiert anschließend 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt und 2x3 min. in PBS Puffer gewaschen.

#### **3. Enzymverdau**

Je 100µl der vorgewärmten Pepsinlösung (II) werden pro Objektträger auf die Schnitte pipettiert, bevor diese dann für ca. 10 min. bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert werden. Je nach Fixierungsart und -länge (s.o.), Gewebetyp und Enzymkonzentration variiert die optimale Inkubationszeit. Bei zu starkem Verdau werden die Zellkerne und Chromosomenstrukturen zu stark zerstört, die Zellgrenzen sind nicht mehr klar zu erkennen. Zu kurzer Verdau kann dagegen zu einer Unterbewertung der Signalanzahl führen.

Nach dem Enzymverdau werden die Schnitte für 2x3min. in PBS Puffer gewaschen und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) rehydriert und abschließend luftgetrocknet.

#### **4. DNA Denaturierung und Hybridisierung**

Um den lichtempfindlichen Fluoreszenz Farbstoff zu schützen, werden die folgenden Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

Auf ein Deckglas werden je 10-15µl Sonde (Pathvision™HER2 DNA Sonden-KIT, Zymed, (I)) pipettiert und der Objektträger aufgelegt.

Wenn der Schnitt frei von Luftblasen ist werden die Ränder mit Fixogum luftdicht abgeschlossen.

Die Denaturierung und Hybridisierung erfolgt in einem Schritt im PCR (Polymerase Chain Reaction)-Cycler über Nacht.

Die Schnitte werden zunächst für 3 min. bei 95°C denaturiert und anschließend bei 37°C hybridisiert.

#### **5. Entfernung ungebundener Sonde**

Nach Entfernung des Fixogum und des Deckgläschens werden die Schnitte für je 2min. in 2xSSC/NP-40 Puffer zuerst bei 72°C und dann bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend werden die Schnitte für 2 min in PBS Puffer gewaschen, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dann luftgetrocknet.

#### **6. Mounting und Eindeckeln**

Pro Objektträger wird ein Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI verwendet. Die Schnitte werden eingedeckelt und mit Nagellack umschlossen.

## Protokoll zur Methode der FISH-Technik

<b>1.) Fixierung</b>
10 min in 2% Formaldehyd in Methanol, bei -20°C
3 x 3 min waschen in PBS, bei Raumtemperatur
<b>2.) Vorbehandlung</b>
10 min in Spot-Light Vorbehandlungs-Lösung (Zymed), bei 97°C
15 min abkühlen, bei Raumtemperatur
2 x 3 min waschen in PBS
10 min Enzymverdau mit jeweils 100µl der vorgewärmten Enzymlösung (Zymed), bei 37°C
2 x 3 min waschen in PBS
Aufsteigende Alkoholreihe ( 70%-80%-96%-100%)
Trocknen der Objektträger
<b>3.) DNA Denaturierung und Hybridisierung im Dunkeln</b>
10 - 15µl Sonde (Zymed) pro Objektträger; Deckgläschen auflegen, mit Fixogum umschließen
3 min bei 95°C im PCR-Cycler denaturieren
über Nacht bei 37°C hybridisieren
<b>4.) Entfernung der ungebundenen Sonde</b>
2min in 2xSSC/NP-40 Puffer waschen, bei 72°C
2min in 2xSSC/NP-40 Puffer, bei Raumtemperatur
2min in PBS, bei Raumtemperatur
Aufsteigende Alkoholreihe ( 70%-80%-96%-100%)
Trocknen der Objektträger
<b>5.) Mounting</b>
1 Tropfen Vectashild Mounting Medium mit DAPI pro Objektträger, eindeckeln, mit Nagellack umschließen

### **3.7. Methode der Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH)**

#### **1. Hitzebehandlung**

Die Schnitte werden für 15 min. in Zymed SPOT-Light® Gewebe Vorbehandlungs-Reagenz (II) bei 98°C inkubiert und anschließend für 2x3 min. in PBS Puffer gewaschen.

#### **2. Enzymverdau**

Je 100µl der vorgewärmten Pepsinlösung (II) werden pro Objektträger auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgt für ca. 3-4 min. bei 37°C. Je nach Fixierungsart, Gewebetyp und Enzymkonzentration variiert die optimale Inkubationszeit. Bei zu starkem Verdau werden die Zellkerne und Chromosomenstrukturen zu stark zerstört, die Zellgrenzen sind dann nicht mehr klar zu erkennen. Zu kurzer Verdau dagegen führt zu einer Unterbewertung der Signalanzahl.

Nach dem Enzymverdau werden die Schnitte für 2x3min. in PBS Puffer gewaschen und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) rehydriert und dann luftgetrocknet.

#### **3. DNA Denaturierung und Hybridisierung**

Auf ein Deckglas werden je 10-15µl Sonde (SPOT-Light® HER2 DNA Sonden-KIT, Zymed (I)) pipettiert und der Objektträger aufgelegt.

Wenn der Schnitt frei von Luftblasen ist, werden die Ränder mit Fixogum luftdicht abgeschlossen.

Die Denaturierung und Hybridisierung erfolgt in einem Schritt im PCR-Cycler über Nacht.

Die Schnitte werden zunächst für 3 min. bei 95°C denaturiert und anschließend bei 37°C hybridisiert.

#### **4. Entfernung ungebundener Sonde**

Nach Entfernung des Fixogum und des Deckgläschens werden die Schnitte für je 5 min. in 0,5% SSC bei 75°C und anschließend für 2x3 min in Aqua dest. bei Raumtemperatur gewaschen.



## **5. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität**

Unspezifische Färbungen durch endogene Peroxidaseaktivität werden vor allem durch Zellen, die Hämoproteine wie z.B. Hämoglobin (Erythrozyten), Myoglobin (Muskelzellen) oder Cytochrom (Granulozyten, Monozyten) produzieren, verursacht. Zur irreversiblen Hemmung der endogenen Peroxidase werden die Schnitte für 10 min in frisch angesetzten 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert und anschließend 2x3 min in 1xPBS/Tween20 gewaschen.

## **6. Visualisierung der Hybride**

Die Visualisierung der Signale erfolgt in 4 Schritten unter Verwendung des Zymed CISH™ Polymer Nachweis-KIT (III).

Im ersten Schritt erfolgt zunächst eine unspezifische Proteinblockierung für 10 min in einer feuchten Kammer unter Einsatz von Reagenz A. Die Schnitte werden anschließend nicht gespült, sondern nur vorsichtig mit einem Tuch von überstehender Flüssigkeit befreit.

Als zweiter Schritt folgt die Inkubation mit Reagenz B, einem Maus-Anti-Digoxigenin Antikörper. Die Schnitte sollten vollständig bedeckt sein und für 30 (-60) min in einer feuchten Kammer inkubiert werden.

Vor und nach der erneuten Inkubation mit dem HRP-Ziege-Anti-Maus Antikörper (Reagenz C) für 30 (-60) min, welche ebenfalls in einer feuchten Kammer durchgeführt wird, werden die Schnitte für je 2x3 min in 1x PBS/Tween20 gewaschen.

Die im letzten Schritt verwendete Substrat-Chromogen Lösung (DAB) sollte erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden. Dafür werden je ein Tropfen der Reagenzien D1-3 mit 1ml destilliertem Wasser vermischt und die Schnitte damit erneut für 30 min in feuchter Kammer inkubiert und in destilliertem Wasser gespült. DAB wird durch die in Schritt 3 zugeführte exogene Peroxidase umgesetzt.

## **7. Gegenfärbung mit Hämalaun**

Die Zellkerne werden mit Hämalaun für 3 sek. und durch anschließendes 2 minütiges Bläuen gegengefärbt, wodurch eine gute morphologische Übersicht des Gewebes und eine gute

Abgrenzung zu den braunen HER2-Gensignalen gewährleistet werden

## 8. Eindeckeln

Vor der mikroskopischen Betrachtung werden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt und mit Nagellack umschlossen.

### Protokoll zur Durchführung der CISH-Technik

<b>1) Vorbehandlung</b>
15 min in Spot-Light Vorbehandlungs-Lösung (Zymed), bei 98°C
3 x 2 min waschen in Aqua dest.
3-4 min Enzymverdau mit jeweils 100µl der vorgewärmten Enzymlösung (Zymed), bei 37°C
3 x 2 min waschen in Aqua dest.
Aufsteigende Alkoholreihe ( 70%-80%-96%-100%)
Trocknen der Objektträger
<b>2) Denaturierung und Hybridisierung</b>
10 - 15µl Sonde(Zymed) pro Objektträger; Deckgläschen auflegen, mit Fixogum umschließen
3 min bei 95°C im PCR-Cycler denaturieren
über Nacht bei 37°C hybridisieren
<b>3) Entfernung ungebundener Sonde</b>
5 min waschen in 0,5% SSC, bei 75°C
3 x 2 min waschen in Aqua dest.
<b>4) Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität</b>
Blockierung der endogenen Peroxidase 10 min in 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol (frisch angesetzt)
2 x 3min waschen in 1xPBS/Tween20 (0,025)
<b>5) Visualisierung der Hybride</b>
Proteinblockierung mit Reagenz A; 10 min in feuchter Kammer
Primärer Antikörper: Inkubation mit Maus-Anti-Digoxigenin für 30 min in feuchter Kammer
2 x 3 min waschen in 1 x PBS/Tween20
Sekundärer Antikörper: Inkubation mit polymerisiertem HRP-Ziege-Anti-Maus für 30min in feuchter Kammer

2 x3 min waschen in 1 x PBS/Tween20
DAB-Chromogen-Präparation für 30min in feuchter Kammer (je 1Tropfen der Reagenzien D1-3 auf 1ml Aqua dest.)
2 min waschen in Aqua dest.
<b>6) Gegenfärbung mit Hämalaun</b>
<b>7) Eindeckeln mit Eukitt</b>

#### 4. Auswertung

##### **4.1. Hämalaun&Eosin Färbung**

Die H&E Färbung dient zur Kontrolle auf vorhandene invasive Tumoranteile und zur Orientierung im Gewebe. Die genaue Lokalisation der Tumorzellen im Präparat wurde identifiziert, markiert und danach mit den FISH bzw. CISH behandelten Präparaten verglichen.

##### **4.2. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Die Interpretation der Hybridisierungssignale wurde an einem Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung der drei Einfachbandpass-Filter DAPI, Green und Orange bei 60-facher Vergrößerung in Öl durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm „Metacyte *ISIS* FISH Imaging System“ verwendet. Die Auswertung erfolgte ausschließlich an den invasiven Tumorarealen, welche mit den Arealen des H&E Präparats korrespondierten.


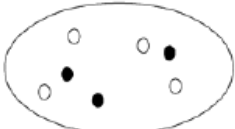




Nach einer ersten Orientierung bei 10-facher Vergrößerung wurden die Präparate mit dem 100er-Ölimmersionsobjektiv und den verschiedenen Filtern auf ihre Qualität überprüft.

Im Falle störender Hintergrundaktivität des Gewebes oder nicht eindeutig zu erkennenden oder fehlenden Sondersignalen wurde die FISH-Analyse wiederholt. Nach den Vorgaben der Firma Vysis wurden für jedes Präparat durch mäanderförmiges Abfahren des Objektträgers 60 Zellkerne bewertet und das Ergebnis in einer Auswertungstabelle (Abbildung 8) dokumentiert.

Um alle Signale zu erfassen war ein Durchfokussieren auf den verschiedenen Tumorzellkernebenen erforderlich.

Für eine korrekte Auswertung mussten folgende Kriterien erfüllt sein (Abbildung 7):

- einzeln liegende Zellkerne (keine Überlappung)
- erkennbare Zellgrenzen
- Auszählung von Signalen ausschließlich innerhalb des Zellkerns
- Präsenz von  $\geq 1$  Sondensignal von jeder Farbe pro Zellkern
- Bewertung von zwei Signalen gleicher Größe mit einem Abstand kleiner oder gleich des Durchmessers der Einzelsignale als ein Signal (gesplittetes Signal)

	2 HER-2/neu-Signale und 2 CEP17-Signale.
	3 HER-2/neu-Signale und 4 CEP17-Signale.
	Keine Auswertung. Die Zellkerne sind überlappend. Einige Signale können nicht eindeutig zugeordnet werden.
	Keine Auswertung. Der Zellkern enthält nur HER-2/neu-Signale und keine CEP17-Signale.
	2 HER-2/neu-Signale und 1 CEP17-Signal. Ein HER-2/neu-Signal ist gesplittet.
	2 HER-2/neu-Signale und 3 CEP17-Signale. Ein HER-2/neu-Signal und ein CEP17-Signal sind gesplittet.

**Abbildung 7:** Beispiele und Richtlinien zum Auszählen der Signale in Anlehnung an die Empfehlungen der Firma Vysis: ●= HER2-Gensignal, ○= CEP 17-Zentromersignal

HER-2/neu <sup>1</sup>	CEP17 <sup>2</sup>											TOTAL
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11-15												
16-20												
21-30												
31-40												
41-60												
61+												
TOTAL												

**Abbildung 8:** Dokumentations-Tabelle

Um eine vorhandene HER2-Genamplifikation nachzuweisen, wurde für jedes Präparat der Quotient (Vysis Ratio) aus der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Gensignale (ungerundet) und der durchschnittlichen Anzahl der CEP 17-Zentromersignale (ungerundet) errechnet und auf eine Nachkommastelle gerundet. Dadurch ist es möglich eine reine Genamplifikation des HER2-Gens von einer Polyploidie des Chromosoms 17 zu unterscheiden. Die Polyploidie wird in ca. 8% der HER2 positiven Patientinnen beobachtet. Eine akzeptierte Definition für die Polyploidie liegt derzeit jedoch nicht vor. Bei Downs-Kelly und Mitarbeiter (2005) liegt der Schwellenwert für eine Polyploidie bei drei Chromosom 17-Kopien, bei Dal Lago und Mitarbeiter (2006) wird sie mit 4 bis 6 Kopien definiert. Der Quotient aus HER2-Gensignalen und Chromosom 17-Zentromersignalen beschreibt also den Amplifikationsgrad des Gens. Unabhängig von der Anzahl der Chromosom 17-Kopien beschreibt ein Quotient von  $\geq 2.2$  das eindeutige Vorliegen einer Amplifikation, ein Wert von  $< 1.8$  spricht gegen eine Amplifikation. Werte zwischen 1.8 und  $< 2.2$  sind als grenzwertig zu betrachten. Sie werden in der vorliegenden Arbeit als fraglich amplifiziert beschrieben. In der klinischen Anwendung gilt allerdings eine HER2-Ratio von  $\geq 2$  als positiv und ist damit eine Indikation zur Trastuzumab-Therapie.

**Tabelle 4:** Auswertungskriterien nach Angaben des Herstellers (Vysis-Ratio)

HER2/CEP 17-RATIO	<1.8	1.8 – 2.2	>2.2
Amplifikationsgrad	nicht amplifiziert	fraglich amplifiziert	amplifiziert

Ergänzend erfolgte eine fotografische Dokumentation unter Verwendung des Programms ISIS® In Situ Imaging System (ISIS FISH Imaging System, MetaSystems, Althusenheim, Deutschland). Das Farbfluoreszenz-Bildaufnahme System ermöglicht eine schnelle und einfache digitale Bildaufnahme, Speicherung und Dokumentation von FISH-Bildern. Dabei werden die Einzelaufnahmen der Tumorzellkerne, HER2-Gensignale und CEP 17 Zentromersignale durch additive Farbmischung zu einem Foto zusammengeführt. So entstand für jedes Präparat eine Reihe von 5-10 digitalen Aufnahmen verschiedener Tumorzellkerne.

#### **4.3. Chromogen-*in situ*-Hybridisierung (CISH)**

Im Unterschied zur Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erfolgt die Interpretation der Chromogen-*in situ*-Hybridisierungssignale an einem Standard-Hellfeld-Durchlicht-Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Die Auswertung wird ebenfalls ausschließlich an den invasiven Arealen des Tumors vorgenommen, welche direkt im Präparat wie auch zuvor am H&E Schnitt identifizierten wurden. Zuerst wurden die Präparate bei 10-facher Vergrößerung auf ihre Qualität überprüft. Für die Auswertung musste mindestens ein punktförmiges HER2-Gensignal pro Zellkern der meisten Tumorzellen und normalen Zellen nachweisbar sein. Bei schlechter Gewebequalität oder nicht eindeutig zu erkennenden oder fehlenden SONDENSIGNALEN wurde die CISH-Analyse wiederholt.

Um eine HER2-Genamplifikation nachzuweisen, wurde für jedes Präparat die durchschnittliche Anzahl der HER2-Gensignale ermittelt und auf eine Nachkommastelle gerundet. Wenn die einzelnen HER2-Gensignale zu dicht beieinander lagen und somit die genaue Anzahl nicht zu

bestimmen war, wurden die Signale dieser Präparate als so genannte „Cluster“ beschrieben. Die Anzahl der ausgezählten HER2-Gensignale beschreibt den Amplifikationsgrad des Gens. Mehr als 10 Hybridisierungssignale oder das Vorliegen von Clustern in mindestens 50% der Tumorzellkerne sprechen für das Vorliegen einer starken Amplifikation. 1-5 Signale wurden als nicht amplifiziert eingestuft. Bei 6-10 Signalen in mehr als 50% der Tumorzellkerne wurde das Präparat als schwach amplifiziert eingestuft. Diese Einteilung berücksichtigt, dass eine erhöhte Anzahl von Hybridisierungssignalen (mehr als 5) auch durch eine chromosomale Polyploidie in den Tumorzellen bedingt sein kann ohne diese jedoch direkt nachweisen zu können.

**Tabelle 5:** Auswertungskriterien nach Angaben des Herstellers (Zymed)

<b>Amplifikationsgrad</b>	<b>keine Amplifikation</b>	<b>schwache Amplifikation</b>	<b>starke Amplifikation</b>
<b>HER2-Gensignale pro Nukleus</b>	1-5 Signale in >50% der Tumorzellen	6 - 10 Signale in >50% der Tumorzellen	>10 Signale oder große Genkopie-Cluster in >50% der Tumorzellen

## 5. Statistische Auswertung

Zur univariablen Untersuchung einer Assoziation zwischen einzelnen klinischen und pathologischen Variablen (Hormonrezeptorstatus, Differenzierungsgrad, T-Stadium, histopathologischer Subtyp) mit dem HER2-Status wurden der  $\chi^2$ - und der unabhängige T-Test verwendet. Die Übereinstimmung zwischen der FISH- und CISH-Diagnostik wurde der Cohen's kappa ( $\kappa$ ) benutzt.  $\kappa$  quantifiziert das Maß der Übereinstimmung nachdem eine Zufallskorrektur durchgeführt wurde.  $\kappa$ -Werte können zwischen 0 und 1 variieren. Ein Wert von 0 repräsentiert einen puren Zufall, 0.1-0.4, 0.4 -0.75, und 0.75-1.0 entsprechen einer schlechten, intermediären und guten Übereinstimmung der FISH und CISH Diagnostik. Abschließend

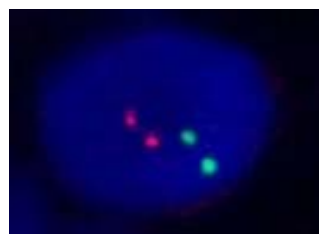
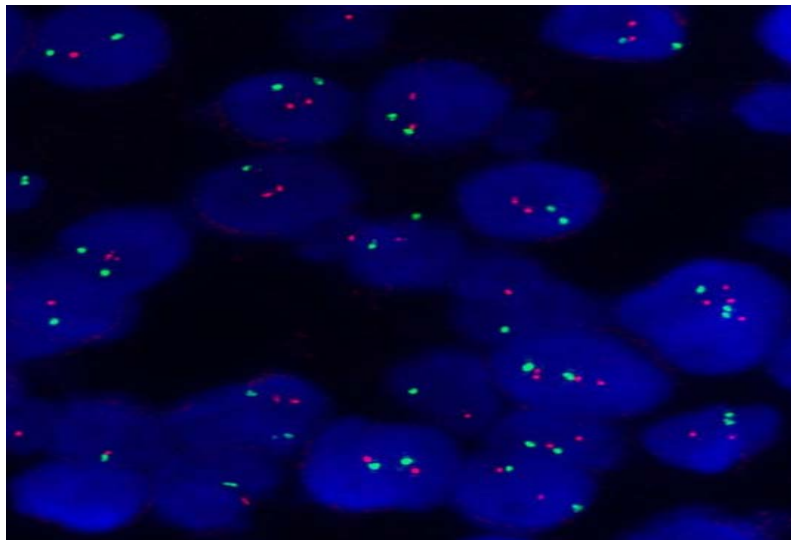
wurden die Sensitivität, Spezifität und positiver bzw. negativer prädikativer Wert basierend auf einer 4-Felder-Tafel berechnet. Alle statistischen Tests wurden mit dem Statistik-Programm SPSS, Version 15.0 für Windows, Chicago, Illinois, USA durchgeführt. Alle Tests sind zweiseitig und das Signifikanzniveau von 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.



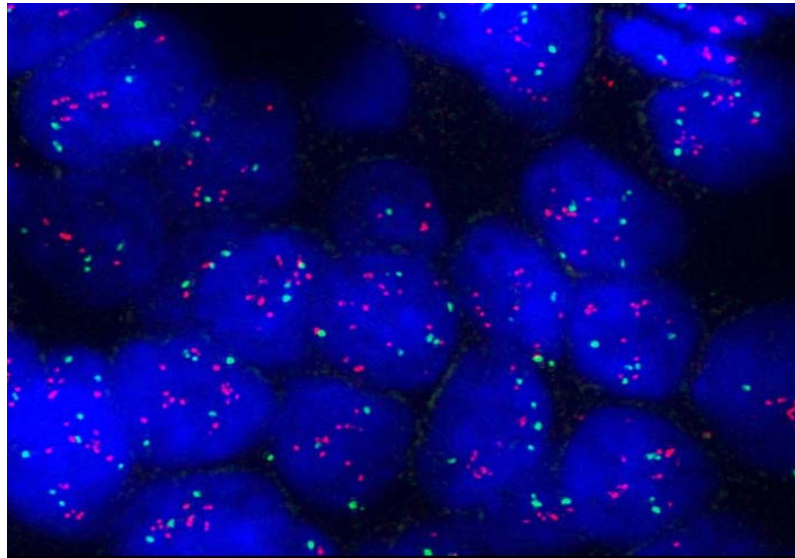
## IV. Ergebnisse

### 1. Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

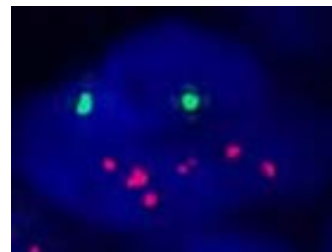
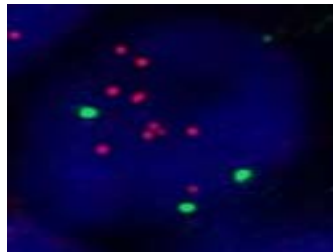
Der HER2-Status wurde prospektiv in Mammakarzinomen von 100 Patientinnen mittels FISH-Technik ermittelt. Wie oben beschrieben, wurden dafür die Hybridisierungssignale des HER2-Gens und die CEP17-Zentromersignale in 60 Tumorzellen gezählt und als Ratio zusammengefasst. Nach den Vorgaben der Firma Vysis wurden Präparate mit einer Ratio von kleiner 1,8 als nicht amplifiziert, Präparate mit einer Ratio zwischen 1,8-2,2 als fraglich amplifiziert und mit einer Ratio von größer 2,2 als amplifiziert eingeteilt. In Abbildung 9 sind die Beispiele für die verschiedenen Amplifikationsgrade dargestellt.



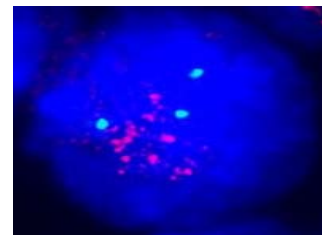
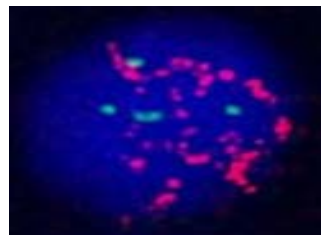
A)



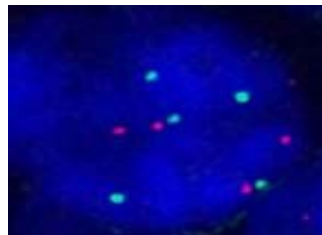
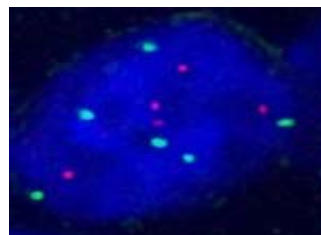
B)



C)



D)

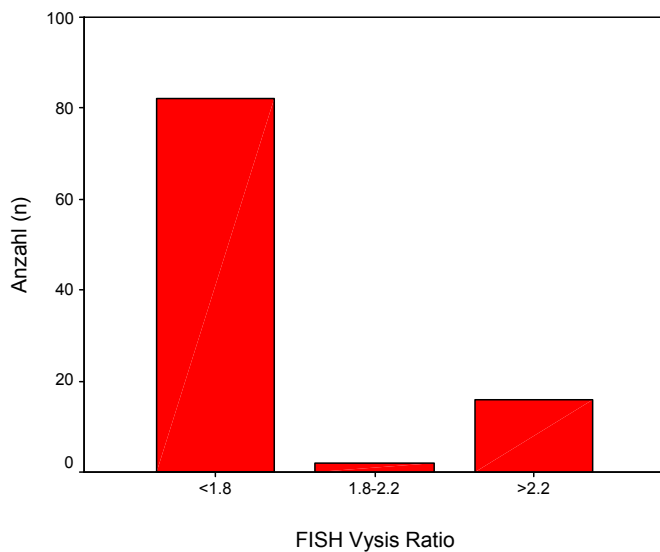


**Abbildung 9:** (A-E): HER2-Status in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen. Färbung mittels Pathvision HER2 DNA Sonden-Kit. Genlocus von HER2: Rote Signale; Genlocus des Zentromerbereich von Chromosom 17 (CEP17): Grüne Signale

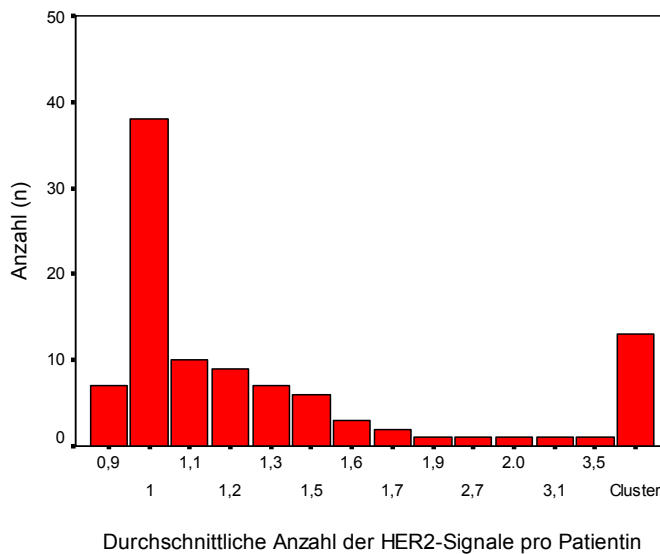
- A) Normaler HER2-Status mit je zwei Signalen für HER2 und CEP17 (FISH-Ratio:1)
- B) Amplifikation mit einer FISH-Ratio von  $\geq 2,2$
- C) Amplifikation mit Clustern
- D) Polyploidie mit  $\geq 3$  Chromosom 17- / HER2-Signalen und FISH-Ratio von  $\leq 1$

Eine eindeutige Amplifikation des HER2-Gens konnte in 16 Fällen (16%) nachgewiesen werden, wohingegen in 82 Fällen (82%) ein normaler, diploider HER2-Status vorlag. Lediglich 2% der Präparate konnten nicht eindeutig als positiv oder negativ eingeordnet werden und wurden somit als fraglich amplifiziert bezeichnet (Abbildung 10 a).

Die Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin, die mit FISH ermittelt wurde, ist in Abbildung 10b dargestellt.



**Abbildung 10a:** FISH Vysis Ratio: Kategorien (n=100)  
 Kategorien: <1.8= nicht amplifiziert; 1.8-2.2= fraglich amplifiziert; >2.2= amplifiziert

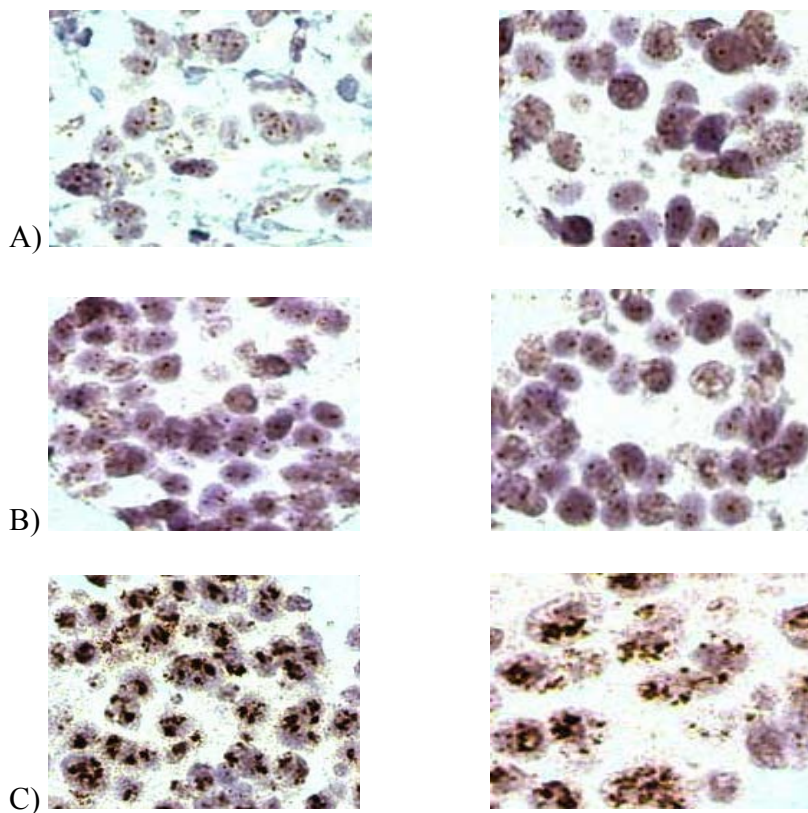


**Abbildung 10b:** Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin

## 2. Ergebnisse der Chromogen-*in situ*-Hybridisierung

In den Tumoren aller 100 Patientinnen wurde der HER2-Status ebenfalls prospektiv mit der CISH-Technik ermittelt. Ein Wert von bis zu 6 Signalen wurde als nicht amplifiziert, ein Wert von 6 bis 10 Signalen als schwach amplifiziert gewertet. Wenn durchschnittlich mehr als 10 Signale pro Zellkern detektiert wurden, lag eine starke Amplifikation vor.

Die verschiedenen Amplifikationsgrade sind in Abbildung 11 dargestellt.



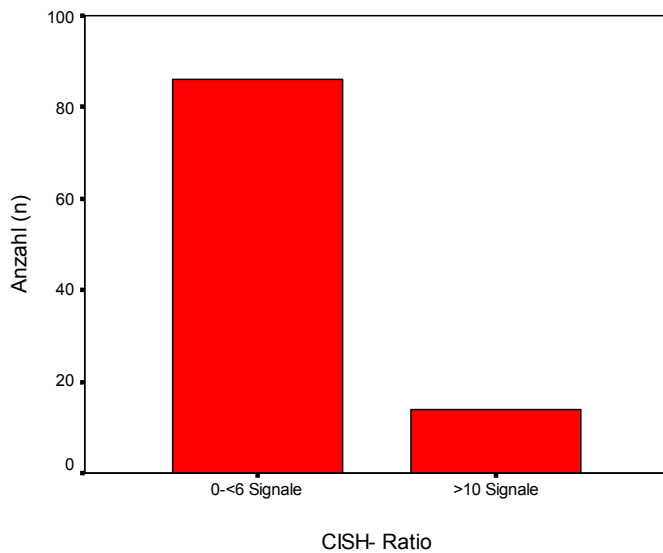
**Abbildung 11:** (A-C): HER2-Status in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen. Färbung mittels Zymed Spot-Light HER2 CISH-Kit. Genlokus von HER2: braune Signale

- A) und B) Normaler HER2-Status mit je zwei HER2-Signalen pro Zellkern
- C) Cluster der HER2-Signale: Indikativ für eine HER2-Genamplifikation

Auch mit der CISH-Untersuchung wurde eine eindeutige Mehrheit der nicht amplifizierten Präparate mit einer Häufigkeit von 86% nachgewiesen. Eine eindeutige Amplifikation des HER2-

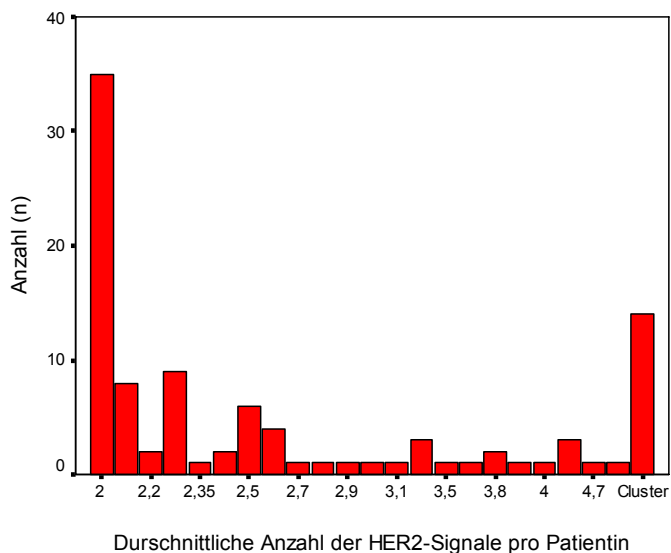
Gens wiesen 14% der Präparate auf. Kein Präparat wurde als schwach amplifiziert bewertet (Abbildung 12a).

Die Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin, die mit CISH ermittelt wurde, ist in Abbildung 12b dargestellt.



**Abbildung 12a:** CISH: Kategorien (n=100)

Kategorien: 0-6 = nicht amplifiziert; 6-10 = schwach amplifiziert; >10 = amplifiziert



**Abbildung 12b:** Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin

### 3. Untersuchung des Ploidiegrades

Tabelle 6 zeigt die Präparate, die eine Polyploidie aufwiesen. Polyploidie, die nach Downs-Kelley et al. (2005) vorliegt, wenn durchschnittlich  $\geq 3$  CEP17-Zentromersignale pro Zellkern detektiert werden, konnte bei 14/100 Patientinnen identifiziert werden. Nach Dal Lago et al. (2006) liegt Polyploidie dagegen erst bei einer durchschnittlichen Anzahl von 4-6 Chromosom 17-Kopien pro Zelle vor, ein Zustand, der in Tumoren von 8 der 100 Patientinnen nachgewiesen wurde. Unter Anwendung dieser Definitionen betrug die Anzahl der CEP17-Zentromersignale bei diesen Patientinnen 3 bis 4,8 bzw. 4 bis 4,8. Die Anzahl der HER2-Gensignale dieser Fälle lag zwischen 2,9 und 7,8, bzw. 4,81 und 7,8. Die sich hieraus ergebende CEP17/HER2-Ratio zeigte bei 13 bzw. 7 Patientinnen Werte zwischen 1 und 1,7 ( $<1,8$  = kein Amplifikation). Lediglich ein Tumor wurde mit einer Ratio von 2,0 als fraglich amplifiziert klassifiziert. Es gab keinen Fall, der parallel mit FISH und CISH als schwach amplifiziert (6-10 Signale) bzw. amplifiziert ( $>10$  Signale) eingestuft wurde (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Polyploide Fälle

Patientin	Polyploidie: $\geq 3$ CEP17 Signale*	Polyploidie: 4-6 CEP17 Signale**	HER2- Signale (FISH)	CEP17- Zentromer- Signale	FISH- Ratio	HER2- Signale CISH
401	polyploid	polyploid	5,89	4,8	1,2 negativ	2 negativ
472	polyploid	polyploid	6,3	4,47	1,5 negativ	3,6 negativ
430	polyploid	polyploid	5,58	4,46	1,3 negativ	3,5 negativ
461	polyploid	polyploid	4,81	4,34	1,1 negativ	4,1 negativ
482	polyploid	polyploid	5,56	4,32	1,3 negativ	3,8 negativ
419	polyploid	polyploid	5,4	4,2	1,3 negativ	4,7 negativ
410	polyploid	polyploid	5,83	4	1,5 negativ	3,3 negativ
442	polyploid	polyploid	7,8	4	2,0 fragl. amplifiziert	5,4 negativ
463	polyploid	-	5,52	3,73	1,5 negativ	4,1 negativ
464	polyploid	-	6,12	3,52	1,7 negativ	3,9 negativ
425	polyploid	-	3,88	3,48	1,1 negativ	3,3 negativ
409	polyploid	-	4,3	3,25	1,3 negativ	2,6 negativ
453	polyploid	-	3,55	3,047	1,2 negativ.	2,3 negativ
480	polyploid	-	2,9	3	1 negativ.	2 negativ

\*nach Downs-Kelley et al. (2005); \*\* nach Dal Lago et al. (2006)

#### 4. Ergebnisse der HER2-Immunhistochemie

Die im Rahmen der Routinediagnostik am Institut für Pathologie der Universität Hamburg durchgeführte HER2-Immunhistochemie (IHC) ergab bei 51% der verwendeten Präparate ein negatives Ergebnis (0, 1+), 33 % der Fälle waren fraglich amplifiziert (2+), und 16 % zeigten eine deutliche Überexpression des HER2-Rezeptors (3+) (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Immunhistochemie: DAKO-Score 0 - 3+

DAKO-Score	0	1+	2+	3+
Anzahl n(%)	24 (24)	27 (27)	33 (33)	16 (16)

#### 5. Korrelation zwischen dem HER2-Status und pathomorphologischen Daten

##### **5.1. Klinische und pathomorphologische Daten der Studienpatientinnen**

In Tabelle 8 sind die klinischen und pathomorphologischen Daten der Studienpatientinnen, die vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt wurden, aufgeführt. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Tumorresektion lag bei 57,7 Jahren, wobei die jüngste Patientin 28 und die älteste Patientin 83 Jahre alt war. Histomorphologisch waren 75% der Mammakarzinome vom invasiv duktalem Typ und 14% vom invasiv lobulären Typ. Die übrigen 11% setzten sich aus muzinösen, kribiformen, tubulo-lobulären, tubulären, metaplastischen oder nicht weiter bezeichneten invasiven Karzinomen zusammen und wurden hier als *Sonstige* zusammengefasst. In 90% der Fälle handelte es sich um Tumoren mit den pathologischen Stadien T1-2. Lediglich 8% der untersuchten Fälle zeigten bereits ein organüberschreitendes Wachstumsmuster. Die Mehrheit der Karzinome (88%) war mäßig bis schlecht differenziert (G2-3), und nur 12% waren gut differenziert. Insgesamt war die große Mehrheit der Tumoren Steroidrezeptor-positiv (91%).

**Tabelle 8:** Pathomorphologische Daten der Studienpatientinnen

	Anzahl (n, %)
<b>Patientinnen insgesamt</b>	100 (100)
<b>Alter (Jahre)</b>	
Durchschnittsalter	57.7
Median	58
SD	12.4
Range	28-83
<b>Histopathologischer Typ</b>	
Invasiv duktal	75 (75)
Invasiv lobulär	14 (14)
Sonstige	11 (11)
<b>Östrogenrezeptorstatus</b>	
positiv	78 (78)
negativ	21 (21)
unbekannt	1 (1)
<b>Progesteronrezeptorstatus</b>	
positiv	89 (89)
negativ	10 (10)
unbekannt	1 (1)
<b>Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorstatus</b>	
positiv	91 (91)
negativ	8 (8)
unbekannt	1 (1)
<b>Grading</b>	
G1	12 (12)
G2	50 (50)
G3	38 (38)
<b>Pathologisches Stadium (UICC 2002)</b>	
T1	52 (52)
T2	38 (38)
T3	5 (5)
T4	3 (3)
Unbekanntes T Stadium	2 (2)
N0	48 (48)
N1	19 (19)
N2	1 (1)
N3	3 (3)
Unbekanntes N Stadium	29 (29)



## 5.2. HER2-Status und Tumorgröße

Ein Zusammenhang zwischen zunehmender Tumorgröße und dem HER2-Status, der durch FISH und CISH sowie IHC ermittelt wurde, konnte nicht nachgewiesen werden (p Werte  $\geq 0.4$ ). Exemplarisch ist in Tabelle 9 die pathologisch ermittelte Tumorgröße (pT) gegen den durch FISH bestimmten HER2-Status (HER2/CEP17-Ratio) aufgetragen.

**Tabelle 9:** Tumorgröße (pT) vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

pathologisches Stadium	FISH (HER2/CEP17-Ratio)			Gesamt (n)	X <sup>2</sup> test
	negativ (<1.8)	fraglich (1.8-2.2)	amplifiziert (>2.2)		p-Wert
pT1 (n)	42	2	8	52	0.8
pT2 (n)	30	-	8	38	
pT3 (n)	5	-	-	5	
pT4 (n)	3	-	-	3	
<b>Gesamt (n)</b>	<b>80</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>98</b>	

## 5.3. HER2-Status und Differenzierungsgrad

Auch der Vergleich von Differenzierungsgrad und HER2-Status nach FISH und CISH sowie IHC zeigte keine signifikante Korrelation (*p-Werte*  $> 0,05$ ). In Tabelle 10 ist der in der FISH-Diagnostik ermittelte HER2-Status (HER2/CEP17-Ratio) in Abhängigkeit zum Differenzierungsgrad (Grading G) der Tumoren aufgeführt.

**Tabelle 10:** Grading vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

Grading	FISH (HER2-CEP17-Ratio)			Gesamt (n)	X <sup>2</sup> test
	negativ (<1.8)	fraglich (1.8-2.2)	amplifiziert (>2.2)		p-Wert
G1 (n)	12	-	-	12	0.2
G2 (n)	42	1	7	50	
G3 (n)	28	1	9	38	
<b>Gesamt (n)</b>	<b>82</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>100</b>	

#### **5.4. HER2-Status und histologischer Tumortyp**

Der über FISH, CISH oder IHC ermittelte HER2-Status wies keinen signifikanten Zusammenhang zum Tumortyp (invasiv duktal, invasiv lobulär, Sonstige) auf ( $p\text{-Werte} > 0.05$ ). In Tabelle 12 ist der durch FISH ermittelte HER2-Status (HER2/CEP17-Ratio) in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp aufgeführt.

**Tabelle 12:** HER2 und histologischer Tumortyp

Histopathologischer Typ	FISH (HER2-CEP17-Ratio)			Gesamt (n)	X <sup>2</sup> test p Wert
	Negativ (<1.8)	Fraglich (1.8-2.2)	Amplifiziert (>2.2)		
Invasiv duktal(n)	57	2	16	75	0.1
Invasiv lobulär(n)	14	-	-	14	
Sonstige (n)	11	-	-	11	
Gesamt (n)	82	2	16	100	

#### **5.5. HER2-Status und Hormonrezeptorstatus**

Weder Östrogen- noch Progesteronrezeptorstatus korrelierten einzeln betrachtet oder zusammengefasst mit dem durch FISH, CISH oder IHC ermittelten HER2-Status ( $p\text{-Werte} > 0.05$ ). In Tabelle 11 ist der durch FISH ermittelte HER2-Status (HER2/CEP17-Ratio) in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus zusammengefasst aufgeführt.

**Tabelle 11:** Hormonrezeptorstatus (Östrogen und Progesteron) vs. FISH (HER2/CEP17Ratio)

Hormon-Rezeptor-Status	FISH (HER2-CEP17-Ratio)			Gesamt (n)	X <sup>2</sup> test p Wert
	Negativ (<1.8)	Fraglich (1.8-2.2)	Amplifiziert (>2.2)		
Negativ (n)	5	-	3	8	0.2
Positiv (n)	76	2	13	91	
Gesamt (n)	81	2	16	99	

Nach unseren Ergebnissen konnten wir somit 5 Patientinnen identifizieren, die Östrogen-/Progesteron- sowie HER2-FISH-negativ waren. Diese Patientensubgruppe wird als „Triple-negativ“ bezeichnet. Die Ergebnisse mittels CISH-Analyse in dieser Subgruppe waren identisch.

Die Karzinome aller 5 Patientinnen zeigten histologisch einen schlechten Differenzierungsgrad (G3) (Ergebnisse nicht gezeigt).

## **6. Vergleich der FISH- und CISH-Ergebnisse**

In den folgenden Tabellen 13, 14 und 15 wurden die Ergebnisse der FISH-Diagnostik den CISH-Ergebnissen gegenübergestellt. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung von FISH und CISH. In 96% der Fälle (n=96) konnten die Ergebnisse entweder mit beiden Methoden als negativ, also nicht amplifiziert (n=82), oder mit beiden Methoden als amplifiziert (n=14) kategorisiert werden.

Zwei Tumorpräparate (2%) wiesen eine fragliche HER2-Amplifikation nach FISH auf, waren jedoch in der CISH-Diagnostik negativ (Tabelle 15: Patientin 401 und 426).

Nur in 2% (n=2) der Fälle führten die beiden Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. Diese beiden Fälle waren mit der FISH-Technik als amplifiziert eingestuft worden, mit der CISH-Technik hingegen als nicht amplifiziert (Tabelle 15: Patientin 488 und 443).

In Tabelle 14 wurden die Ergebnisse in nur zwei Gruppen - negativ (nicht amplifiziert) und positiv (amplifiziert) – eingeteilt. Für die FISH-Diagnostik wurde der Schwellenwert einer Ratio von 2,0 verwendet. Diese Einteilung entspricht der aktuellen Indikation zur Trastuzumab-Therapie. Demnach erhalten Patientinnen mit fraglich HER2-amplifiziertem Tumor (FISH-Ratio  $>1,8$  und  $< 2,2$ ) mit einer FISH-Ratio von  $\geq 2,0$  eine Antikörper (Trastuzumab)-Therapie, Patientinnen mit einer Ratio von  $< 2,0$  erhalten diese Therapie dagegen nicht.

Für die CISH-Diagnostik wurde der Schwellenwert von  $\geq 6$  HER2-Gensignalen verwendet. Ab diesem Wert gilt ein Tumor als schwach amplifiziert, was eine Behandlung der Patientin mit Trastuzumab zur Folge hat. Tabelle 14 zeigt demnach, welche Patientinnen je nach verwendeter Diagnostik eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab erhalten bzw. nicht erhalten würden.

Auch hier zeigt sich eine signifikante Übereinstimmung der beiden Methoden mit einem „Kappa-Score of Agreement“ von  $\kappa = 0,886$  ( $p < 0.001$ ).

In 97% der Fälle ( $n=97$ ) würden die Patientinnen nach Verwendung von entweder FISH oder CISH gleich therapiert werden. Eine Trastuzumab-Therapie würden 14% der Patientinnen erhalten ( $n=14$ ), 83% ( $n=83$ ) würden nicht therapiert werden.

In 3% der Fälle ( $n=3$ ), zeigte sich jedoch eine Diskordanz der beiden Methoden. Diese Patientinnen würden demnach unter Verwendung der FISH-Technik eine Antikörper-Therapie mit Trastuzumab erhalten. Unter Verwendung der CISH-Technik bestünde jedoch keine Indikation zur Therapie.

Zusätzlich wurden mit den Werten aus Tabelle 14 die Spezifität und Sensitivität sowie der positiv und negativ prädiktive Wert (PPV, NPV) der CISH-Diagnostik im Vergleich zum Goldstandard FISH ermittelt, wobei die Sensitivität mit 82,4% geringer ausfiel als die Spezifität mit 100%. PPV und NPV lagen bei 100% bzw. 96,5%.

**Tabelle 13:** CISH vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

CISH	FISH (HER2-CEP17-Ratio)			Gesamt (n)
	Negativ (<1,8)	Fraglich (1,8 – 2.2)	Amplifiziert (>2,2)	
Negativ (1-5)	82	2	2	86
Schwach ampl. (6-10)	-	-	-	0
Amplifiziert (>10)	-	-	14	14
<b>Gesamt (n)</b>	<b>82</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>100</b>

**Tabelle 14:** CISH vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio) mit “Kappa Score of Agreement”  
(K=0.886)

CISH*	FISH (HER2-CEP17-Ratio)*		Gesamt (n)	Kappa test p value
	Negativ (<2) =kein Therapie Indikation**	Positiv (≥2) =Therapie Indikation**		
Negativ (<6) =keine Therapie Indikation**	83	3	86	<0.001
Positiv (≥6) =Therapie Indikation**	-	14	14	
Gesamt (n)	83	17	100	

\*Bivariable Kodierung \*\*Antikörper-Therapie mit Trastuzumab

**Tabelle 15:** Überblick über die in FISH und CISH diskordanten Fälle

Patientin	DATEN				
	DAKO-Score	FISH HER2/CEP17- Ratio	HER2- Gensignale	CEP17- Zentromer- signale	CISH
488	2+	Cluster ampl.	Cluster	2	2,6 negativ
443	1+	2,7 ampl.	6,7	2,5	3,8 negativ
401	1+	2,0 fragl. ampl.	7,8	4	5,4 negativ
426	3+	1,9 fragl. ampl.	4,2	2,2	2,8 negativ

**Ergebnisse der bivariablen Analyse:**

Sensitivität=82.4%

Spezifität=100%

positiv prädiktiver Wert (PPV)=100%

negativ prädiktiver Wert (NPV)=96.5%

## **7. Vergleich der FISH-, CISH- und IHC-Ergebnisse**

### **7.1. Vergleich der FISH- und IHC-Ergebnisse**

In Tabelle 16 ist die IHC, ausgedrückt als DAKO-Score, gegen die FISH-Ratio aufgetragen. Von den 51 in der IHC als negativ bewerteten Präparaten, zeigte sich in 49 Fällen (96,1%) eine Übereinstimmung zwischen dem negativen IHC-Ergebnis (DAKO-Score 0, 1+) und der FISH-Diagnostik. Von 16 IHC-positiven Präparaten (DAKO-Score 3+) wurden 14 (87,5%) ebenfalls als FISH-positiv bewertet. Zusammengefasst als IHC-negative und IHC-positive Präparate und unter Ausschluss der fraglichen IHC-Ergebnisse (DAKO-Score 2+) ergab sich somit eine Übereinstimmung in 94% der Fälle. Insgesamt gab es vier (6%) im Ergebnis voneinander abweichende Präparate. Davon zeigte eines ein negatives Ergebnis in der IHC, war aber in der FISH-Diagnostik fraglich amplifiziert. Ein in der IHC als positiv bewertetes Präparat war ebenfalls in der FISH-Diagnostik als fraglich amplifiziert bewertet worden. Nur ein Präparat (n=2; 2%) zeigte eine Überexpression in der IHC, aber ein negatives FISH-Ergebnis und ebenfalls lediglich ein Fall wies eine HER2-Genamplifikation in der FISH bei negativem immunhistochemischen Befund auf.

Insgesamt wurden 33 Präparate mit einem DAKO-Score von 2+ bewertet. Von diesen nicht eindeutig einzuordnenden Präparaten zeigten 97% (n=32) mit der FISH einen negativen HER2-Status.

Ein positives FISH-Ergebnis lag demnach für die in der IHC mit 0 bewerteten Tumoren in 0%, für die 1+ Fälle in 3,7%, für die 2+ Fälle in 3% und für die als 3+ bewerteten Fälle in 87,5% der Fälle vor. (Tabelle 17).

**Tabelle 16:** IHC (DAKO-Score) vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

DAKO-Score	FISH (HER2-CEP17-Ratio)			Gesamt (n)
	Negativ (<1.8)	Fraglich (1.8-2.2)	Amplifiziert (>2.2)	
0	24	-	-	24
1+	25	1	1	27
2+	32	-	1	33
3+	1	1	14	16
<b>Gesamt (n)</b>	<b>82</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>100</b>

**Tabelle 17:** Prozentuale Verteilung der FISH-Ergebnisse in den einzelnen IHC-Kategorien

FISH (HER2-CEP17-RATIO)	DAKO-SCORE			
	0	1+	2+	3+
FISH-negativ (%)	100	92,6	97	6,25
FISH-fraglich (%)	-	3,7	-	6,25
FISH-positiv (%)	-	3,7	3	87,5

## 7.2. Vergleich der CISH- und IHC-Ergebnisse

Im Vergleich der IHC mit der CISH-Diagnostik zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie im Vergleich IHC/FISH. Einen negativen HER2-Status wiesen sowohl in der IHC als auch in der CISH-Diagnostik 51 der 100 Präparate auf. Hier gab es kein in beiden Methoden unterschiedliches Ergebnis. Von den 16 in der IHC als positiv bewerteten Präparaten waren 14 auch in der CISH positiv. Nur 2 Präparate zeigten ein positives Expressionsmuster (3+) in der IHC, wurden aber in der CISH-Diagnostik als nicht amplifiziert eingestuft. Aufgeteilt in IHC-negative (DAKO-Score 0, 1+), bzw. IHC-positive (DAKO-Score 3+) Präparate und unter Ausschluss der fraglichen IHC-Ergebnisse (DAKO-Score 2+), ergab sich eine Übereinstimmung von 97%.

Die in der IHC als 2+ und damit als fraglich amplifiziert deklarierten Präparate waren zu 100% (n=33) in der CISH-Diagnostik negativ (Tabelle 18).

Ein positives CISH-Ergebnis lag demnach für die in der IHC mit 0,1+ und 2+ bewerteten Fälle bei 0% und für die als 3+ bewerteten Fälle bei 87,5% vor. (Tabelle 19).

**Tabelle 18:** IHC (DAKO-Score) vs. CISH

DAKO-Score	CISH			Gesamt (n)
	negativ (1-5)	Schwach amplifiziert (6-10)	amplifiziert (>10)	
<b>0 (n)</b>	24	-	-	<b>24</b>
<b>1+ (n)</b>	27	-	-	<b>27</b>
<b>2+ (n)</b>	33	-	-	<b>33</b>
<b>3+ (n)</b>	2	-	14	<b>16</b>
<b>Gesamt (n)</b>	<b>86</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>100</b>

**Tabelle 19:** Prozentuale Verteilung der CISH-Ergebnisse in den einzelnen IHC-Kategorie

CISH	DAKO-SCORE			
	0	1+	2+	3+
<b>CISH-negativ (%)</b>	100	100	100	12,5
<b>CISH-schwach(%)</b>	-	-	-	-
<b>CISH-positiv (%)</b>	-	-	-	87,5



## **V. Diskussion**

Der Nachweis der prognostischen und prädiktiven Bedeutung von HER2 beim Mammakarzinom vor über zwanzig Jahren führte in Deutschland im Jahre 2000 zur Einführung von Trastuzumab in die Brustkrebs-Therapie und damit zu einer deutlichen Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens der betroffenen Patientinnen (Cobleigh et al. 1999, Slamon et al. 2001, Burstein et al., 2003, Tedesco et al., 2004; Hicks und Tubbs, 2005; Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005; Joensuu et al., 2006). Als rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper bindet Trastuzumab mit hoher Spezifität an sein Antigen, den HER2-Rezeptor, und hemmt dadurch dessen Signalübertragung zum Zellkern. Auf diese Weise kann es zur Proliferationshemmung der HER2-überexprimierenden Tumorzellen kommen (Baselga et al. 2001, McKeage and Perry, 2002).

Die Richtlinien der American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2007 empfehlen die Bestimmung des HER2-Status routinemäßig für alle Patientinnen mit der Diagnose Brustkrebs (Wolff et al, 2007). Da nur Mammakarzinompatientinnen mit einem positiven HER2-Status (HER2-Rezeptorüberexpression und/oder HER2-Genamplifikation) von der Trastuzumab-Therapie profitieren, ist eine genaue Identifizierung dieser Patientinnen notwendig, um gleichzeitig einen optimalen Therapieeffekt zu erzielen, aber auch um unnötige Therapie und damit einhergehende Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Identifizierung dieser Patientinnen sollte idealerweise durch eine zuverlässige und leicht durchzuführende Diagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität gewährleistet sein.

### **1. Vor- und Nachteile der etablierten Methoden IHC und FISH**

Die beiden derzeit etablierten Methoden zum Nachweis des HER2-Status sind die IHC und die FISH-Diagnostik, wobei die IHC das am meisten verwendete, am schnellsten und einfachsten durchzuführende und vergleichsweise kostengünstigste Verfahren darstellt (Hoang et al. 2000,

Pauletti et al. 2000, Wang et al. 2000, Leyland-Jones 2001, Perez et al. 2000). Die Ergebnisse der IHC werden mit einem einfachen Lichtmikroskop ermittelt, welches zur Standardausstattung eines pathologischen Labors gehört, eine einfache Handhabung bietet und zeitgleich eine Evaluierung der Zellmorphologie ermöglicht. Die IHC-Signale sind gut zu archivieren, da sie lange sichtbar bleiben (van de Vijver et al., 2007). Jedoch unterliegt die immunhistochemische Bestimmung des HER2-Status in der Praxis starken methodischen Schwankungen. Vor allem die Verwendung unterschiedlicher Systeme und Assays in der Routinediagnostik kann die Ergebnisse der IHC beeinflussen (Jacobs et al., 1999, Hanna 2001). Dazu gehörten außer dem Gebrauch unterschiedlicher Antikörper, welche in Sensitivität und Spezifität differieren (Lebeau et al., 2001, Thomson et al., 2001, Tsuda et al., 2002, Press et al., 2002, Zhao et al., 2002, Sapino et al., 2003) und gegen verschiedene Epitope des HER2-Rezeptors gerichtet sind (Saez et al., 2006), auch die Unterschiede in der Gewebefixierung und Gewebeverarbeitung (Wang et al. 2000, Bartlett et al. 2001, Hanna 2001, Leyland-Jones 2001, Hsu et al., 2002).

FDA (Food and Drug Administration, USA)-geprüft und als standardisiertes Testverfahren zugelassen sind zur Zeit der HercepTest® der Firma DAKO (DAKO, Glostrup, Dänemark) mit dem polyklonalen Antikörper A085 und Pathway® der Firma Ventana (Ventana Medical Systems/Oncor Inc., Tucson, Arizona, USA) mit dem monoklonalen Antikörper CB11. Zudem erlauben die Bestimmungen der FDA den pathologischen Labors auch die Entwicklung und Anwendung so genannter „home brew assays“, sofern dafür FDA geprüfte Reagenzien verwendet werden (Gutman, 2002).

Die Anwendung dieser unterschiedlichen Assays, aber auch die subjektive Bewertung durch den Untersucher (inter- und intraobserver variation) bei der Auswertung beeinflussen die Ergebnisse der IHC, erschweren einen objektiven Vergleich und stellen damit einen Nachteil gegenüber der FISH-Technik dar (Jacobs et al., 1999, Hanna 2001, Hoang et al. 2000, Bartlett et al. 2001, Madrid und Lo, 2004). In der Praxis ist eine Unterscheidung zwischen einer schwachen, mäßigen

und kräftigen Anfärbung bisweilen sehr schwer zu treffen. Auch kann die Differenzierung zwischen inkomplett und einer kompletten Zellmembrananfärbung und damit zwischen einem IHC-Score von 1+ und 2+ Probleme aufwerfen. Der resultierende prädiktive Stellenwert der IHC ist daher häufig nicht zufrieden stellend (Madrid und Lo, 2004).

Gegenüber der Immunhistochemie zeigt die FISH-Auswertung sowohl eine höhere Sensitivität und Spezifität (Pauletti et al., 1996, Press et al., 1997, Ross und Fletcher 1999) als auch eine höhere Reproduzierbarkeit (Jacobs et al., 2000, Persons et al., 2000). Außerdem ist die FISH-Methode aufgrund der DNA-Stabilität gegenüber Unterschieden in der Gewebefixierung und –verarbeitung weniger empfindlich als die Immunhistochemie. Prä-analytische Faktoren haben also weniger Auswirkung auf die Testergebnisse (Greer et al., 1991, Wang et al., 2000; van de Vivjer et al., 2007). Viele klinische Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass die Bestimmung des HER2-Status auf Gen-Ebene bezüglich des Ansprechens einer Trastuzumab-Therapie eine verlässlichere Vorhersage bietet als der Nachweis einer Rezeptor-Überexpression auf Proteinebene (Jacobs et al., 1999; Pauletti et al., 2000; Tubbs et al., 2001; Park et al., 2003).

Derzeit sind drei kommerziell erhältliche, standardisierte FISH-HER2-Kits von der FDA zur Untersuchung des HER2-Status zugelassen. Sie ermöglichen eine standardisierte Durchführung der FISH. Der Inform™-Kit der Firma Ventana enthält nur eine DNA-Sonde für den HER2-Genlocus, während der PathVysion™-Kit der Firma Vysis, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, und der HER2 FISH PharmDx™-Kit von Dako (Dako, Glostrup, Dänemark) zusätzlich eine DNA-Sonde für den Zentromerbereich des Chromosoms 17 (CEP17) beinhalten. Mit allen drei Kits kann die HER2-Genkopienzahl in individuellen Tumorzellkernen bestimmt werden. Zwischen tatsächlicher Genamplifikation und vermehrten HER2-Genkopien aufgrund einer Chromosom 17-Polyploidie können jedoch nur die Dual-Color-FISH-Technik des PathVysion™-Kits und des HER2-FISH-PharmDx™-Kits differenzieren, da sich das empfohlene Scoring-System auf die HER2/CEP17-Ratio bezieht. Eine Ratio von  $\geq 2,2$  ist als amplifiziert definiert.

Der Inform™ Test hingegen beruht einzig auf der Anzahl der ausgezählten HER2-Signale, wobei mehr als 6 HER2-Signale pro Zellkern als amplifiziert zu bewerten sind.

Zurzeit wird die FISH-Technik allerdings nur in wenigen klinischen Labors zur Routinediagnostik angewandt, da sie methodisch anspruchsvoller als die IHC sowie zeit- und kostenaufwendig ist (Jacobs et al., 1999, Tanner et al., 2000, Wang et al., 2000, Hanna 2001, Lebeau et al., 2001, Leyland-Jones 2001, Perez et al., 2002). Vor allem aber werden durch die Notwendigkeit eines Fluoreszenz-Mikroskops und die damit verbundene erhöhte Anforderung an das Personal viele klinische Labors vor Schwierigkeiten gestellt (Tanner et al., 2000, Isola et al., 2004). Da die FISH-Signale innerhalb weniger Wochen verblassen, ist die Archivierung der Präparate nur mit Hilfe teurer digitaler Kameras möglich.

Unter den etablierten Methoden (IHC und FISH) wird zur Zeit zwar in vielen Arbeiten die Dual-color-FISH-Technik als Goldstandard angesehen (Dowsett et al., 2003; Bartlett et al., 2003; Ma et al., 2005; Hicks und Tubbs, 2005; Bartlett und Forsyth, 2006; Saez et al, 2006), die ASCO-Richtlinien von 2007 weisen jedoch daraufhin, dass bislang anhand vorhandener Daten die Überlegenheit einer der beiden Methoden nicht eindeutig belegt werden konnte (Wolff et al., 2007).

Es wird somit deutlich, dass eine praktische und präzise Methode in der HER2-Diagnostik wünschenswert wäre, die einfach durchzuführen, leicht auszuwerten, standardisiert und reproduzierbar ist, aber ohne die Notwendigkeit eines Fluoreszenz-Mikroskops und die dadurch entstehenden erhöhten Anforderungen an das Personal auskommt.

## **2. Vor- und Nachteile der CISH-Technik**

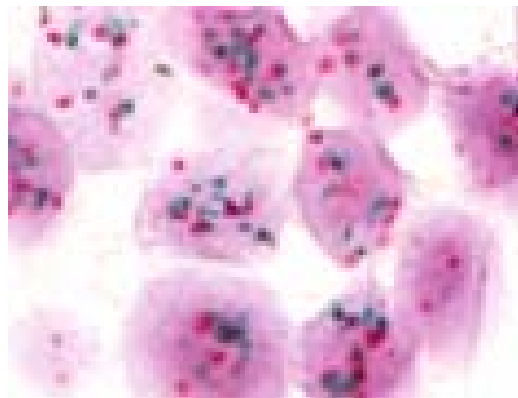
Die CISH-Technik ist bislang von der FDA noch nicht in der HER2-Diagnostik zugelassen.

Sie wird jedoch bereits in zahlreichen Studien als gleichwertige und zuverlässige Alternative zur FISH-Technik angesehen und kombiniert die Verwendung eines Lichtmikroskops mit den

Vorzügen einer in situ-Hybridisierung. Dies stellt einen signifikanten Vorteil gegenüber bisher etablierten Methoden dar. Eine zur zur HER2-Auswertung parallele Begutachtung der Tumormorphologie wird ermöglicht, und auch eine Tumorheterogenität kann unter dem Lichtmikroskop schon in geringer Vergrößerung einfach und schnell erkannt werden. Damit ist auch die wichtige Unterscheidung der invasiven Tumoranteile von nicht invasiven DCIS-Bereichen einfacher als mit der FISH-Technik. Da es bisher keine durch Studien belegte Ergebnisse zur Bedeutung der HER2-Genamplifikation in intraduktalen oder –lobulären (in situ)-Anteilen des Mammakarzinomen (DCIS, LCIS) gibt, ist für die korrekte Auswertung der Präparate entscheidend, dass sie an den invasiven Anteilen des Tumors durchgeführt wird (Wolff et al., 2007). Die CISH-Signale verblassen – im Gegensatz zu den FISH-Signalen - nicht und erlauben daher eine einfache Archivierung auf unbestimmte Zeit ohne Erfordernis spezieller Kameras oder computerisierter Analyse- (Imaging-) Programme. Eine Mehrfach- Analyse in einem Präparat wie bei der Dual-color-FISH-Technik (HER2- und Chromosom 17 Zentromersignale) ist mit der CISH-Technik jedoch bisher nicht einfach möglich gewesen. Daher konnte keine direkte Aussage über den Polyploidie-Grad der einzelnen Präparate getroffen werden. Zwar stand, ähnlich wie bei der Dual-Color-FISH-Technik, für nicht eindeutig auszuwertende Fälle eine Sonde für das Zentromer des Chromosoms 17 zur Verfügung. Anders als bei der FISH-Technik erforderte diese Analyse bisher jedoch eine erneute Hybridisierung eines weiteren Gewebeschnittes und war damit sehr zeit- und kostenaufwendig (Tubbs et al., 2001; Dandachi et al., 2002, Zhao et al., 2002).

Allerdings berücksichtigen die von der FISH abweichenden Auswertungs-Kriterien der CISH, dass eine erhöhte Anzahl von Hybridisierungssignalen (bis zu 5) auch durch eine chromosomale Polyploidie in den Tumorzellen bedingt sein kann. Da die chromosomale Polyploidie von mehr als 5 Chromosomen-Kopien äußerst selten in menschlichen Tumorzellen beobachtet worden ist (Mertens et al., 1997), wird ein Präparat ab sechs HER2-Gen-Kopien in mindestens 50% der Tumorzellkerne als amplifiziert angesehen.

Seit Januar 2008 ist jedoch auch für die CISH eine Methode etabliert worden, mit Hilfe derer eine parallele Auswertung der HER2-Genamplifikation und des Chromosomen17-Status vorgenommen werden kann. Für jede Sonde steht ein Farbdetektionssystem zur Verfügung, und eine Auswertung beider Hybridisierungen ist leicht durchführbar (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** ZytoDot SPEC HER2/CEN17 Dual Color Sonden-Kit der Firma Zytomed (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) zur simultanen HER2/CEP17 Analyse. Genlokus von HER2: Grüne Signale; Genlokus des Zentromerbereich von Chromosom 17 (D17Z1): Rote Signale

Vor- und Nachteile der beiden Hybridisierungs-Techniken sind in Tabelle 20 zusammen gefasst.

**Tabelle 20:** Vor- und Nachteile der Hybridisierungs-Techniken FISH und CISH

FISH	CISH
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Standardisierte und FDA-geprüfte Methode zum Nachweis des HER2-Genstatus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zur Routinediagnostik noch nicht zugelassene Methode</li> </ul>

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Mehrfach-Analyse (HER2/CEP17) und damit Nachweis einer Polyploidie möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Bisher keine Mehrfachanalyse und damit keine direkte Aussage über den Polyploidiegrad möglich <i>(Seit Januar 2008: neuer Kit ermöglicht simultane Auswertung von HER2/CEP17 )</i></li> </ul>
Nachteile	Vorteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Modernes und teures Fluoreszenz-Mikroskop erforderlich</li> <li>● Keine routinemäßige Anwendung in allen pathologischen Labors. Oftmals keine ausreichende Schulung des Personals in der Ergebnisinterpretation</li> <li>● FISH-Signale nur mit Hilfe teurer digitaler Kameras und spezieller Computer-Programme archivierbar.</li> <li>● Zellmorphologie und Tumorerogenität nur im parallelen Vergleich mit einem H&amp;E gefärbten Schnitt sichtbar. Keine gleichzeitige morphologische Bewertung und Analyse der HER2-Signale.möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Auswertung mit einem einfachen Lichtmikroskop möglich</li> <li>● Gewohnter Umgang mit den immunhistochemisch gefärbten Präparaten der CISH-Diagnostik.</li> <li>● Chromogen-Signale der CISH-Diagnostik einfach archivierbar, da beständig.</li> <li>● Gute Übersicht über Morphologie und Tumorerogenität im selben Präparat, zeitgleiche Beurteilung zur Signalauswertung möglich. Invasive Anteile leicht von DCIS-Bereichen unterscheidbar</li> </ul>

### **3. Diskussion der eigenen Ergebnisse**

#### **3.1. Anteil der HER2-positiven Tumoren im Kollektiv**

In der hier vorliegenden Arbeit wurden von 100 Fällen mittels IHC 16 % als amplifiziert bewertet, mit der FISH-Technik waren es 17% und mit der CISH-Technik 14%. Nach einer Metaanalyse von Révillion et al. (1998) an einem Kollektiv von 22616 Patientinnen wurde eine HER2-Amplifikation bzw. -Überexpression in durchschnittlich 26% der Mammakarzinome bei einer Streubreite der einzelnen Studien von 5 bis 55% nachgewiesen. Mit 14-17% lag der prozentuale Anteil der amplifizierten Mammakarzinome in dieser Arbeit etwas niedriger, jedoch innerhalb der angegebenen Streubreite der bisherigen veröffentlichten Daten. Die enorme Streubreite der einzelnen Studien ist auf die unterschiedlich großen Kollektive, auf eine mögliche unterschiedliche regionale Verteilung bestimmter Tumortypen, auf die eingesetzten Methoden, verwendeten Antikörper sowie auf unterschiedliche Auswertungssysteme zurückzuführen. So wird z.B. in dieser Arbeit zwischen fraglich (FISH-Ratio 1,8-2,2) und eindeutig (FISH-Ratio > 2,2) amplifiziert unterschieden, wohingegen in anderen Arbeiten für ein positives FISH-Ergebnis ein Schwellenwert von 2,0 gilt. Ebenso werden in der CISH-Auswertung unterschiedliche Schwellenwerte (z.B. >5 oder >6 Gensignale) verwendet. Dennoch ist die Übereinstimmung zwischen FISH, CISH und IHC in dieser Arbeit so eindeutig, dass man davon ausgehen kann, dass die Amplifikationsrate im verwendeten Kollektiv tatsächlich um die 14-17% liegt.

#### **3.2. Korrelation von HER2 mit klinisch-pathologischen Faktoren**

Der in einigen Studien beschriebene Zusammenhang zwischen klinischen Faktoren (Grading, Progesteron-/Östrogen-Rezeptorstatus, histopathologischer Typ) und einem positiven HER2-Status konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (alle p Werte > 0.05). Prati und Mitarbeiter zeigten, dass Östrogen-/Progesteron-negative Tumoren signifikant mit einem positiven HER2-Status assoziiert waren (Prati et al., 2005). Zusätzlich demonstrierten Ariga et al. (2005) einen



statistisch signifikanten univariaten Zusammenhang zwischen einem positiven HER2-Status und dem histologischen Subtyp (duktales vs. lobuläres Mammakarzinom,  $p < 0.0003$ ), dem negativen Östrogen- ( $p = 0.0001$ ) bzw. Progesteron- Status ( $p < 0.0001$ ) und einem schlechten Differenzierungsgrad ( $p = 0.0009$ ). Sapino und Mitarbeiter bestätigten den signifikanten Zusammenhang zwischen einem positiven HER2-Status mit dem Differenzierungsgrad und dem histologischen Subtyp (Sapino et al., 2003). Die Autoren zeigten in einer Analyse von 106 Mammakarzinomen, dass kein gut differenzierter Tumor (G1) eine HER2-Genamplifikation aufwies. Diese Ergebnisse führten zunächst zu der Schlussfolgerung, dass zukünftig die HER2-Diagnostik nur an ausgewählten Tumoren, die bestimmte klinisch-morphologischen Eigenschaften aufweisen, durchzuführen sei (Sapino et al., 2003). Diese Assoziationen werden allerdings kontrovers diskutiert. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sowie die unserer eigenen Arbeit bestätigen die Korrelation zwischen HER2-Status und histologischem Tumortyp, Differenzierungsgrad (Park et al., 2003; Madrid und Lo, 2004) bzw. Hormonrezeptorstatus (Bilous et al., 2006) nicht. Eine Vorauswahl bestimmter Tumoren aufgrund der klinisch-pathologischen Parameter ohne die teure und aufwendige HER2-Diagnostik durch IHC und ISH ist demnach zur Zeit nicht möglich und wird auch von den 2007 erschienenen Leitlinien der American Society of Clinical Oncology bzw. dem College of American Pathologists nicht empfohlen (Wolff et al., 2007).

In unserem Kollektiv konnten wir in 5% einen dreifach negativen (HER2, ER, PR-, „triple“ negativ) Tumor nachweisen. In der Literatur wird eine Prävalenz zwischen 10-17% angegeben (Cleator, Heller, Coombes 2007). Die geringere Anzahl lässt sich in unserem Kollektiv am ehesten durch die geringe Gesamtfallzahl erklären. Alle Karzinome in dieser Subgruppe waren schlecht differenziert (G3) und zeigten in der FISH und CISH identische Ergebnisse. Der Zusammenhang zwischen der „triple-Negativität“ und einer starken Aggressivität dieser Tumoren sowie einem schlechten Differenzierungsgrad wird auch in der aktuellen Literatur beschrieben (Cleator, Heller, Coombes 2007, Reis-Filho und Tutt, 2008).

### **3.3. Vergleich der Ergebnisse aus IHC und FISH**

Die Ergebnisse der beiden etablierten Methoden IHC und FISH zeigen bei dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv mit 94% eine hohe Übereinstimmung für alle IHC-negativen (0/1+) und -positiven (3+) Fälle und entsprechen damit den Ergebnissen anderer publizierter Studien (Isola et al., 1999, Jacobs et al., 1999, Hoang et al., 2000, Jimenez et al., 2000, Mass et al., 2000, Ridolfi et al., 2000, Wang et al., 2000, Birner et al., 2001, Lebeau et al., 2001, Lehr et al., 2001, Onody et al., 2001). In die einzelnen IHC-Scoring-Kategorien unterteilt ergeben sich für die hier vorliegende Arbeit die folgenden Ergebnisse:

Alle Tumoren (n=24), die in der IHC mit 0 bewerteten wurden, sind auch in der FISH-Diagnostik als nicht amplifiziert eingestuft worden. Somit besteht eine 100%ige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen beiden Methoden in dieser IHC-Kategorie.

Unter den mit 1+ bewerteten Fällen (n=27) gibt es zwei falsch negative Fälle (7,4%), wovon einer mit der FISH als amplifiziert (*FISH-Ratio 2,7; HER2-Signal 6,73; CEP17-Signal 2,47*), der andere als fraglich amplifiziert (*FISH-Ratio 2,0; HER2-Signal 7,8; CEP17-Signal 4*) bewertet wurde. Der fraglich amplifizierte Fall weist mit durchschnittlich vier Chromosom17-Kopien pro Zelle zudem eine Polyploidie auf. Wären diese zwei Tumoren (7,4%) lediglich mit der FISH-Diagnostik auf ihren HER2 Status getestet worden, wäre beiden Patientinnen eine Trastuzumab-Therapie ermöglicht worden.

Interessanterweise ist die Rate der Genamplifikation der in der IHC mit 2+ bewerteten Fälle in dieser Arbeit mit 3% vs. 7,4% sogar geringer als unter den als 1+ klassifizierten Tumoren.

Dies mag in dieser Arbeit aber am ehesten auf die geringen Fallzahlen der einzelnen IHC-Kategorien zurückzuführen sein. Eine Meta-Analyse von Dendukuri und Mitarbeitern über die Genamplifikationsrate unter den als IHC 2+ bewerteten Tumoren ergab in dieser IHC-Kategorie einen deutlich höheren Durchschnitt der FISH-positiven Ergebnisse von 30% (Dendukuri et al., 2007). Jedoch zeigt sich in der vorhandenen Literatur eine enorme Streubreite der einzelnen Studien mit Genamplifikationsraten von 0% (Hoang et al., 2000; Loring et al., 2005, Roche et al.,

2002) bis 100% (Press et al., 2002) unter den als 2+ klassifizierten Tumoren. Erneut erklären methodische Faktoren, wie der jeweils verwendete Antikörper (Press et al., 1994, Lebeau et al., 2001), die Gewebefixierung und -verarbeitung (Wang et al., 2000, Hanna 2001, Lebeau et al., 2001) sowie die subjektive Beurteilung (inter- und intra- individuelle Varianz) der Intensität der immunhistochemischen Anfärbung und das mögliche Fehlen einer eindeutigen Membranfärbung diese außerordentlich große Variabilität der bisher publizierten Ergebnisse.

Unter den 16 in der IHC als positiv bewerteten Fällen (3+) zeigen zwei (12,5%) in der FISH-Diagnostik keine (*FISH-Ratio 1*) bzw. eine fragliche Amplifikation mit einer FISH-Ratio von 1,9 (*HER2-Signal 4,2; CEP17-Signal 2,2*). Diese Fälle sind womöglich in der IHC falsch-positiv bewertet worden und wären bei ausschließlicher IHC-Diagnostik somit eventuell übertherapiert worden. Daher empfehlen einzelne Studien zur Kosteneffizienz in der HER2-Diagnostik nicht nur die Tumore der 2+-Kategorie, sondern alle in der immunhistochemischen Färbung positiven Tumore (3+) mittels FISH zu bestätigen. Dadurch könnten, trotz der relativ kostenaufwendigen FISH-Technik, die Kosten der HER2-Diagnostik durch Vermeidung unnützer Therapien bei falsch-positiven Patientinnen gesenkt werden (Seidemann 2001, Elkin et al., 2003, Dendukuri et al., 2007). In einigen Ländern (z.B. Belgien) erhalten sogar nur Patientinnen mit einem positiven FISH-Ergebnis eine Trastuzumab Therapie, gänzlich unabhängig von der IHC (Neyt et al., 2005). Jedoch muss bedacht werden, dass in äußerst seltenen Fällen eine Überexpression ohne bestehende Genamplifikation durch eine erhöhte Aktivierung der Transkription (Pauletti et al., 1996, Jimenez et al., 2000) oder einen verminderten Abbau der mRNA (Kallioniemi et al., 1992; Pauletti et al., 1996) hervorgerufen werden kann. Da dies mit der in situ-Hybridisierung natürlich nicht detektiert werden kann, würden durch alleinige Therapie der Patientinnen mit positivem HER2-Genstatus die eventuell ebenfalls profitierenden Patientinnen mit negativem HER2-Genstatus aber positivem Rezeptorstatus fälschlicherweise nicht therapiert werden.

Allerdings konnten Tubbs und Mitarbeiter in einer Studie zu diesem Thema, mit IHC-positiven, aber FISH-negativen Fällen, durch Messung der HER2-Genamplifikation und gleichzeitiger

RNA-RNA-Hybridisierung der mRNA die Hochregulation dieser nicht bestätigen (Tubbs et al., 2001) und führen die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Methoden allein auf eine falsch-positive, unspezifische Anfärbung in der IHC zurück.

Die Rate der falsch-positiven IHC-Fälle mit dem HerceptTest wird in einigen Arbeiten sogar mit bis zu 50% angegeben (Jacobs et al., 1999). Daher empfehlen Tubbs und Mitarbeiter die Testung aller IHC positiven, also 2+- und 3+-Fälle, wenn nicht sogar die ISH als einzig gültige Nachweismethode zur Bestimmung des HER2-Status (Tubbs et al., 2001). Auch Pauletti und Mitarbeiter betrachten bei nicht übereinstimmenden Fällen den Nachweis der Genamplifikation als die prognostisch wichtigere Information (Pauletti et al, 2000).

### **3.4. Vergleich der etablierten Methoden (IHC/FISH) mit der CISH-Technik**

Seit der ersten Studie von Tanner und Mitarbeitern im Jahre 2000 über den Stellenwert der CISH-Technik im Vergleich zur IHC und der FISH-Technik sind viele weitere Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht worden. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich jedoch um die erste in Deutschland durchgeführte Untersuchung zum Vergleich der FISH- und CISH-Technik.

#### **3.4.1. IHC vs. CISH**

In bisher publizierten Studien wurde eine relativ hohe Übereinstimmung der CISH-Ergebnisse mit denen der IHC gezeigt. Bei 173 in der IHC mit 3+ bewerteten und CISH-positiven Fällen sowie allen IHC-negativen (0, 1+) und CISH-negativen Fällen demonstrierten Dandachi und Mitarbeiter eine hohe Übereinstimmung von 95,9% (Dandachi et al., 2002). Bei Madrid und Lo betrug diese Übereinstimmung bei 160 Patientinnen sogar 100% (Madrid und Lo, 2004). In einer aktuellen Arbeit aus dem Jahr 2007 zeigten van de Vijver und Mitarbeiter an 211 Patientinnen eine Übereinstimmung zwischen IHC 3+ und CISH-positiven und IHC- und CISH-negativen Fällen von 91,2% (van de Vijver et al., 2007).

Die Übereinstimmung von IHC- und CISH-negativen sowie IHC- und CISH-positiven Tumoren in der vorliegenden Arbeit beträgt 97% und entspricht damit den bereits veröffentlichten Daten.

Es zeigt sich insgesamt sogar eine geringgradig höhere Übereinstimmung der IHC- und CISH-Ergebnisse. Alle 51 Fälle (100%) mit einem negativen Rezeptor-Status in der IHC (DAKO-Score 0, 1+) waren auch in der CISH-Diagnostik als HER2-negativ bewertet worden. Die beiden IHC 1+ Fälle, welche in der FISH als positiv bzw. fraglich-amplifiziert bewertet worden waren, konnten in der CISH-Diagnostik nicht als amplifiziert bestätigt werden.

Auch alle in der IHC als 2+ bewerteten Tumoren waren in der CISH-Diagnostik HER2-negativ.

Abweichende Ergebnisse zwischen IHC und CISH gab es nur bei zwei (12,5%) der insgesamt 16 in der Immunhistochemie als positiv (3+) befundenen Fälle. Parallel hierzu waren beide Fälle auch in der FISH-Diagnostik als nicht- (*FISH-Ratio 1*) bzw. als fraglich-amplifiziert (*FISH-Ratio 1,9*) eingestuft worden. Der in der FISH fraglich-amplifizierte Fall wies zwar mit einer durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale von 4,2 einen erhöhten Wert auf. Die durchschnittliche Anzahl der HER2-Signale im CISH war mit 2,8 hingegen weniger erhöht. Diese „falsch-positiven“ IHC Fälle repräsentieren demnach am ehesten eine unspezifische Anfärbung. In den neuesten Richtlinien der ASCO (2007) wurde daher ein differenzierteres Auswertungsschema für die IHC-Beurteilung empfohlen. Anstatt >10%, wird nun Membrananfärbung in >30% der invasiven Tumorzellen für ein positives IHC-Ergebnis (3+) benötigt. Andererseits ist jedoch auch nicht sicher auszuschließen, ob nicht auch eine Polyploidie, also eine erhöhte Chromosomen17-Anzahl ohne bestehende Amplifikation, zu einer erhöhten HER2-Proteinexpression beitragen kann

Insgesamt wird derzeitig jedoch weiterhin am bestehenden Test-Algorithmus und an der bestehenden Therapieindikation festgehalten (Wolff et al., 2007).

### **3.4.2. FISH vs. CISH**

Auch die meisten Studien, die die Ergebnisse aus FISH und CISH miteinander verglichen, kamen insgesamt zu überaus übereinstimmenden Ergebnissen (Tanner et al., 2000; Dandachi et al., 2002; Zhao et al., 2002; Arnould et al, 2003; Gupta et al., 2003; Isola et al., 2004; Vera-Roma et al., 2004; Saez et al., 2005; Hanna und Kwok, 2006; Bilous et al., 2006; Lambros et al., 2007; van de Vijver et al., 2007). Die Übereinstimmung zwischen FISH und CISH bewegte sich in den verschiedenen Arbeiten zwischen 84% (Gupta et al., 2003; Paper Madrid) und 100% (Zhao et al., 2002). Eine Übersicht wichtiger Studien zum Vergleich von FISH und CISH ist in Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 21:** Übersicht vorheriger Studien zum Vergleich von FISH und CISH

<b>Studie</b>	<b>Patientinnenanzahl (n)</b>	<b>Übereinstimmung in % (n)</b>
Tanner et al., 2000	157	95% (n=147)
Zhao et al., 2002	62	100% (n=62)
Arnould et al., 2003	75	96% (n=72)
Gupta et al., 2003	31	84% (n=26)
Isola et al., 2004	192	94% (n=180)
Saez et al., 2005	174	95% (n=165)
Hanna, Kwok, 2006	254	95% (n=242)
van de Vijver et al., 2007	211	87% (n=187)
<b><i>Eigene Ergebnisse</i></b>	<b><i>100</i></b>	<b><i>96% (n=96)</i></b>

In der hier vorliegenden Arbeit wiesen insgesamt 96% aller untersuchten Tumoren ein übereinstimmendes Ergebnis auf. Lediglich für vier der 100 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle wurden diskrepante Ergebnisse erhalten.

Eine Übereinstimmung der FISH- und CISH-Ergebnisse lag in 100% der 82 FISH-negativen Fälle vor. Von den 16 in der FISH-Diagnostik als amplifiziert eingestuften Fällen zeigten 14 ebenfalls ein positives CISH-Ergebnis. Dies entspricht einer Übereinstimmung von 87,5%.

Jedoch wurden zwei Fälle (12,5%) der FISH-positiven Gruppe als CISH-negativ bewertet. Auch die beiden mit der FISH-Technik als fraglich-amplifiziert bewerteten Fälle sind in der CISH als nicht amplifiziert eingestuft.

Diese vier abweichenden Ergebnisse können zum einen dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche Areale heterogener Tumoren mit beiden Methoden ausgewertet wurden. Eventuell wurden im FISH, trotz paralleler Überprüfung des Präparates in der H&E-Färbung und mäanderförmigen Abfahrens des gesamten Schnittes, Areale des Tumors ausgewertet, die einen überdurchschnittlich hohen Anteil an HER2-amplifizierten Zellen aufweisen. Zum anderen zeigten mehrere Studien, dass gerade im Bereich der „low-level“ Amplifikation, also von 4-10 Genkopien, bzw. einer FISH-Ratio von 2,0-4,0 eine große Variabilität in der Auswertung auftreten kann (Isola et al., 2004; van de Vijver, 2007). Jedoch ist der Anteil der „low-level“ Amplifikation bei Brustkrebspatientinnen insgesamt außerordentlich gering. In dieser Arbeit lagen 4% der Fälle mit einer Ratio zwischen 2,0 und 4,0 im FISH, bzw. 6% der Fälle mit einer Gensignal Anzahl zwischen 4-10 in CISH in diesem Bereich. Van de Vivjer, sowie Isola und Mitarbeiter schätzen den Anteil der „low-level“ amplifizierten Fälle in Mammakarzinomen auf lediglich 1-4%.

Zwei der vier diskordanten Fälle dieser Arbeit weisen in der FISH-Auswertung mit einer HER2-Ratio von 2,0 und 2,7 eine „low-level“ Amplifikation auf. In der CISH-Auswertung fällt einer der diskordanten Tumoren mit einer HER2-Gensignal-Anzahl von 4 ebenfalls in diesen Bereich.

Zusätzlich wird in mehreren Studien das Fehlen einer Chromosom 17-CISH-Sonde beim Vorliegen einer Polyploidie für diskordante Ergebnisse verantwortlich gemacht (Saez et al., 2005; Isola et al., 2004; van de Vijver et al., 2007). Interessanterweise kann in der hier vorliegenden Arbeit jedoch keines der diskordanten Ergebnisse zwischen FISH und CISH auf eine Polyploidie zurückgeführt werden. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass außer als interne Validierung, die Verwendung einer zusätzlichen Chromosom 17-Sonde keine weiteren relevanten Informationen liefert (Tanner et al., 2000; Jimenez et al., 2000; Tubbs et al., 2001; Kumamoto et al., 2001; Wang et al., 2002, Dandachi et al., 2002, Zhao et al., 2002). Dies wird damit begründet, dass durch den neu festgelegten CISH-Grenzwert von  $>6$  Signalen für den Amplifikationsnachweis die meisten Polysomie-Fälle, welche insbesondere im Grenzbereich von 3 bis 5-Gensignalen liegen, aussortiert werden (Vera-Roman, 2004, Madrid et al., 2004; Dal Lago et al., 2006). Auch Isola und van de Vijver beschreiben, dass der Gebrauch dieser zusätzlichen Sonde vor allem im „low-level“ Bereich und damit nur bei einer Minderheit der Fälle zu einer höheren Konkordanz geführt hätte (Isola et al., 2004; van de Vijver, 2007). Zusammenfassend erscheint der Vorteil durch die Verwendung einer zusätzlichen CEP-17-Sonde in Hinblick auf Therapieentscheidung, Kosten- und Zeitaufwand eher gering.

Inzwischen sind jedoch auch Kits entwickelt worden, die eine parallele Auswertung von HER2- und Chromosom17-Zentromer-Signalen erlauben.

In den beiden Gruppen negativ (nicht amplifiziert:  $\text{FISH-Ratio} < 2,0$ ;  $\text{CISH} < 6$ ) und positiv (amplifiziert:  $\text{FISH-Ratio} \geq 2,0$ ,  $\text{CISH} \geq 6$ ) (*siehe auch Tabelle 18 des Ergebnisteils*), die Grundlage für die Trastuzumab-Therapie-Entscheidung sind, zeigte sich eine Übereinstimmung in 97% der Fälle. Drei der 100 Patientinnen hätten aufgrund des FISH-Ergebnisses eine Therapie erhalten müssen, während diese Patientinnen aufgrund der CISH-Ergebnisse nicht mit Trastuzumab therapiert worden wären. Für zwei dieser Patientinnen hätte auch das IHC-Ergebnis keine Trastuzumab-Therapie indiziert, für die dritte Patientin hätte das IHC-Ergebnis von 2+ die Notwendigkeit eines FISH-Tests bedingt.



Insgesamt demonstrieren die in dieser Arbeit vorgestellten prospektiv erhobenen Ergebnisse jedoch eine hervorragende Übereinstimmung der CISH- und FISH-Methodik und bestätigen damit zuvor veröffentlichte Arbeiten (Isola et al., 2004, Tanner et al., 2000; Zhao et al., 2002; Dandachi et al., 2002, Arnould et al., 2003; Tubbs et al., 2003; Saez et al., 2005, Bilous et al., 2006; van de Vijver et al., 2007). Der errechnete  $\kappa$ -Wert des Maßes der Übereinstimmung beträgt 0.89 ( $p < 0.001$ ).  $\kappa$ -Werte können zwischen 0 und 1 variieren. Ein Wert von 0 repräsentiert einen reinen Zufall, 0.1-0.4, 0.4 -0.75, und 0.75-1.0 entsprechen einer schlechten, intermediären und guten Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Sensitivität, Spezifität und der positiv prädiktive Wert der CISH-Technik liegen bei 77,8%, 100%, und 95,3%.

Somit kann die CISH-Technik für die HER2-Testung von Mammakarzinomen als gleichwertige Alternative zur FISH-Methode eingesetzt werden. Darüber hinaus ist durch die Auswertung mit dem Lichtmikroskop die CISH-Methode leichter in die Routinediagnostik zu integrieren. Sie steht somit als ökonomische, leichter durchführbare und sichere Alternative zur FISH-Technik zur Verfügung und könnte diese im derzeit noch empfohlenen Test-Algorithmus mit der IHC ersetzen. Jedoch müssen weitere prospektive Arbeiten mit größeren Fallzahlen zeigen, ob CISH als alleinige Methode bessere Ergebnisse liefert als in Kombination mit der IHC.

## VI. Zusammenfassung

Die Kenntnis des HER2-Status von Mammakarzinomzellen ist für die Entscheidung, bei Mammakarzinompatientinnen eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin®) durchzuführen, von entscheidender Bedeutung. Zur Bestimmung des HER2-Status kommen derzeit zwei Methoden in der Routinediagnostik zur Anwendung: Die Immunhistochemie zum Nachweis einer Rezeptorüberexpression auf Proteinebene und die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung zum Nachweis einer Genamplifikation. Beide Methoden weisen jedoch Nachteile auf. So ist die immunhistochemische Bestimmung des HER2-Status eine relativ einfach durchzuführende und in der Routinediagnostik gut etablierte Methode, unterliegt in der Praxis jedoch starken methodischen Schwankungen. Demgegenüber zeigt die FISH-Auswertung zwar eine höhere Sensitivität und Spezifität sowie eine höhere Reproduzierbarkeit, jedoch ist sie im Vergleich mit der Immunhistochemie ein weitaus zeit- und kostenaufwendigeres Verfahren. .

Aufgrund der Nachteile der beiden Methoden wurde unlängst die CISH-Technik als Alternative in der HER2-Diagnostik eingeführt. Diese Methode kombiniert die *in situ*-Hybridisierung mit den Vorzügen eines Lichtmikroskops und bietet daher signifikante Vorteile gegenüber den beiden oben genannten etablierten Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Stellenwert der CISH gegenüber den etablierten Methoden-FISH und IHC untersucht. Dafür wurde der HER2-Status von 100 Mammakarzinom-Patientinnen prospektiv jeweils mittels FISH und CISH analysiert und mit der Expression des HER2-Rezeptors in der Immunhistochemie verglichen.

Die Ergebnisse der FISH- und CISH-Methodik zeigten mit 96% der Fälle eine außerordentlich hohe Korrelation mit einem p-Wert von  $<0,001$ . Alle mittels FISH-Diagnostik als HER2-positiv bewerteten Patientinnen wurden in der CISH ebenfalls richtig klassifiziert. Dies entspricht einer

Spezifität und einem positiv prädiktiven Wert der CISH-Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der FISH-Methodik von 100%, bzw. 95,3%.

Auch zwischen der IHC und CISH zeigte sich eine überwiegende Übereinstimmung der Ergebnisse in 97% der Fälle.

Zusammenfassend kann aufgrund der erhobenen Ergebnisse, die die Gleichwertigkeit der CISH-Technik gegenüber dem Goldstandard FISH demonstrieren, der Einsatz der CISH-Technik im Testalgorithmus mit der IHC empfohlen werden.

Allerdings konnte der in einigen Studien beschriebene Zusammenhang zwischen Hormonrezeptorstatus, Tumorstadium, histopathologischen Tumortyp und Grading mit einem positiven HER2-Status in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Daher sollten nach wie vor alle Brustkrebs-Patientinnen unabhängig von klinisch-morphologischen Faktoren auf den HER2-Status überprüft werden.

## VII. Literaturverzeichnis

AGO (Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie) Kommission Mamma (2005/2007)  
Diagnosis and treatment of patients with primary and metastatic breast cancer  
Guidelines of the AGO Breast Commission  
www.ago-online.org

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986)  
The product of the human c-erbB2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity  
Science 232:1644-1646

Allred DC, Swanson PE (2000)  
Testing for erbB-2 by immunohistochemistry  
Am J Clin Pathol 113:171-175

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

Andreasen PA, Kjöllér L, Christensen L, Duffy MJ (1997)  
The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review  
Int J Cancer 72:1-22

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002)  
Krebs in Deutschland  
3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken

Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P (2005)  
Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma  
Breast J 11(4):278-80

Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO, Couturier J (2003)  
Agreement between chromogenic in situ hybridization (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer  
Br J Cancer 88:1587-1591

Bartlett J, Forsyth A (2006)  
Detection of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer  
Methods Mol Med 120:309-322

Bartlett J, Going J, Mallon E, Watters A, Reeves J, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R, Cooke TG (2001)  
Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer  
J Pathol 195:422-428

Bartlett J, Mallon E, Cooke T (2003)

The clinical evaluation of HER-2 status: Which test to use?

J Pathol 199:411-417

Baselga J (2001)

Herceptin alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trials

Oncology 61:14-21

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J (1998)

Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts

Cancer Res 58:2825-2831

Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Sommerfield MR (2001)

2000 update of the recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology.

J Clin Oncol 19:1865-1878

Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Tomasic G, van de Vijver M (2003)

Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines

Mod Pathol 16:173-182

Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G (2006)

Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry

Pathology 38(2):120-124

Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, Kubista E, Kwasny W, Kandioler-Eckersberger D, Gnant M, Jakesz R (2001)

Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer

Clin Cancer Res 7:1669-1675

Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SAW, Killander D, McGuire WL (1990)

HER-2/*neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer.

Cancer Res 50:4332-4337

Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf S, Riethmüller G, Pantel K (2001)

ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients.

Cancer Res 61:1890-1895

Burstein HJ, Harris L, Marcom P, et al. (2003)  
Trastuzumab and Vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm.  
J Clin Oncol 21:2889-95

Burstein HJ (2005)  
The distinctive nature of HER2-positive breast cancers  
N Engl J Med 16:1652-4

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ (2006)  
Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer  
J Natl Cancer Inst 98:1183-1192

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco R, De Placido S (1996)  
c-erbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases  
J Clin Oncol 10:2702-2708

Carney WP, Leitzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A (2007)  
HER-2/neu diagnostics in breast cancer  
Breast Cancer Res 9:207

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shephard HM (1992)  
Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy  
Proc Natl Sci USA 89:4285-4289

Cleator S, Heller W, Coombes RC (2007)  
Triple-negative breast cancer: therapeutic options  
Lancet Oncol 8:235-244

Climent MA, Segui MA, Peiro G, Molina R, Lerma E, Ojeda B, Lopez-Lopez JJ, Alonso C (2000)  
Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer.  
HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment  
Breast 10:67-77

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G, Slamon DJ (1999)  
Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease  
J Clin Oncol 17:2639-2648

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

Crump M, O'Malley F, Pritchard K, Levine M, Johnson M, Breast Cancer Disease Site Group (2001)

The use of trastuzumab (Herceptin™) for the treatment of metastatic breast cancer and methods for assessing HER2/neu status - an evidence summary

Current Oncol 7:242-251

Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, et al (2006)

Correction for chromosome 17 is critical for determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer (BC)

Mol Cancer Ther 5:2572-2579

Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C (2002)

Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma

Lab Investig 82:1007-1014

Dendukuri N, Khetani K, McIsaac M, Brophy J (2007)

Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis  
CMAJ 176(10):1429-1434

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

Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al (2005)

The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: A fluorescent in situ hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA in situ hybridization study

Am J Surg Pathol 29:1221-1227

Dowsett M, Allred DC on Behalf of the Trans-ATAC Investigators (2006)

Relationship between quantitative ER and PgR expression and HER2 status with recurrence in the ATAC trial

Breast Cancer Res Treat 100 (suppl 1)

Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, et al (2003)

Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER2 in 426 breast carcinomas from 37 centres.

J Pathol 199:418-423

Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E, Walker R (2000)  
Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?  
Eur J Cancer 36:170-176

Elkin EB, Weinstein MC, Winer EP, et al (2004)  
HER2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer : a cost-effectiveness analysis  
J Clin Onkol 22:854-863

Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M (2001)  
Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial  
J Clin Oncol 19:3808–3816

Elston CW, Ellis IO (1991)  
Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up  
Histopathology 19:403-410

Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin D (2004)  
GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide,  
Version 2.0. IARC Press, Lyon

Foekens JA, Atkins D, Zhang Y, Sweep FC, Harbeck N, Paradiso A, Cufer T, Siewerts AM, Talantov D, Span PN, Tjan-Heijnen VC, Zito AF, Specht K, Hoefler H, Golouh R, Schittulli F, Schmitt M, Beex LV, Klijn JG, Wang Y (2006)  
Multicenter validation of a gene expression-based prognostic signature in lymph node-negative primary breast cancer  
J Clin Oncol 24:1665–1671

Fornier MN, Seidman AD, Schwartz MK, Ghani F, Thiel R, Norton L, Hudis C (2005)  
Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate.  
Ann Oncol 16:234–239

Geyer CE, Bryant JL, Romond EH, et al (2006)  
Four year update of cardiac dysfunction on NSABP B-31: A randomized trial of AC-> paclitaxel vs. AC-> paclitaxel with Trastuzumab in HER2 positive, node positive operable breast cancer  
J Clin Oncol 24:23S, abstr 581

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 16:1467-1655

Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM (1991)  
PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effects of fixative and fixation time  
Am J Clin Pathol 95:117-124



Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J (2003)  
Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma  
Lab Invest 82:1007-1014

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch KN, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, Martinez-Tello F, Tiltman A, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Bürki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn HJ (1992)  
Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer  
J Clin Oncol 10:1049-1056

Gutman S (2002)  
Regulatory issues in tumor marker development  
Semin Oncol 29:294-300

Hanna W (2001)  
Testing of HER2 status  
Oncology 61 (suppl 2):22-30

Hanna W, Kwok K (2006)  
Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm  
Mod Pathol 19:481-487

Hanke J, Solinas-Toldo S, Hoheisel J (1997)  
Genomanalyse und Gendiagnostik, 51-91  
In: Ganten D., Ruckpaul K.: Molekular- und Zellbiologische Grundlagen;  
1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Lebeau A, Parmanetter W, Untch M (2001)  
Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom, 39-43  
In: Tumorzentrum München: Manual Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge;  
8. Aufl., Zuckerschwerdt, München, Bern, Wien, New York

Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Pölcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M (1999)  
HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer  
Int J Oncol 14:663-671

Harbeck N, Thomssen C (2002)  
Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom, 16-23  
In: State of the Art Meeting Gravenbruch 2002: Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome  
Zuckerschwerdt, München

Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S, Everett T, Harpole T, Moore MB, Berry DA, Rizzeri D, Vredenburgh JJ, Bentley RC (2001).  
Comparison of methods measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated  
with high-dose chemotherapy.  
J Clin Oncol 19:1698-1706

Hayes DF, Picard MH (2006)  
Heart of darkness: The downside of trastuzumab  
J Clin Oncol 24:4056-4058

Hayes DF, Thor AD (2002)  
c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker.  
Semin Oncol 29:231-245

Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirrincione CT, Rodrigue SP, Berry DA, Younger J, Panasci LL, Millard F, Duggan DB, Norton L, Henderson IC (2001)  
Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients  
with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662  
Clin Cancer Res 7:2703-2711

Hicks DG, Tubbs RR (2005)  
Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical  
review with interpretive guidelines  
Hum Pathol 36:250-61

Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N (2000)  
HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and  
interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma  
Am J Clin Pathol 113:852-859

Hsu Cy, Tak DM, Yang CF, Lai CR, Yu IT, Chiang H (2002)  
Interobserver reproducibility of HER2 protein overexpression in invasive breast carcinoma using  
the DAKO HercepTest  
Am J Clin Pathol 118:693-698

Hsu S, Raine M, Fanger H (1981)  
Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques:  
A comparison study between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures  
J Histochem Cytochem 29:577-580

Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J (1994)  
Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in  
situ hybridization  
Cytometry 16:93-99

Isola J, Chu L, DeVries S, Matsumura K, Chew K, Ljung BM, Waldman FM (1999)  
Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas  
Clin Cancer Res 5:4140-4145

- Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke T, Watters A, Bartlett J (2004)  
Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization  
Clin Cancer Res 10:4793-4798
- Izumi Y, Xu L, Di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK (2002)  
Tumor biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail  
Nature 416:279-280
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ (1999)  
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 (2000)  
HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry: A study of interlaboratory agreement  
Am J Clin Pathol 113:251-258
- Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka O, Visscher DW (2000)  
Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: A comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization  
Mod Pathol 13:37-45
- Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. (2006)  
Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer  
N Engl J Med 354:809-820
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldmann FM, Pinkel D, Gray JW (1992)  
ERBB2 amplification in breast cancer analysed by fluorescence in-situ hybridization  
Proc Natl Acad Sci 89:5321-5325
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y (1996)  
ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer.  
EMBO J 15:254-264
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985)  
Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma  
Science 229:974-976
- 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 96:4995-5000
- 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

- Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y (2000)  
Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2  
Cancer Res 60:3384-3388
- Koeppen HKW, 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
- Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ (2003)  
Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer  
J Natl Cancer Inst 95:142-153
- Kong SY, Nam BH, Lee KS, Kwon Y, Lee SE, Seong MW, Lee DH, Ro J (2006)  
Predicting tissue HER2 status using serum HER2 levels in patients with metastatic breast cancer  
Clin Chem 52:1510-1515
- Kreienberg R, Volm T, Alt D (2002)  
Krankheitsbild Mammakarzinom  
In: Management des Mammakarzinoms, Kreienberg R, Volm T, Möbus V & Alt D (eds), Auflage. Pp. 3-6. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York
- Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R (2001)  
Chromogenic in situ hybridization analysis of HER2 status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy  
Pathol Int 51:579-584
- Lambros M, Natrajan R, Reis-Filho J (2007)  
Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer  
Human Pathology 38:1105-1122
- 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
- Lebeau A, Löhrs U (2001)  
HER-2- Diagnostik beim Mammakarzinom, 9-13  
In: Aktuelle Onkologie: Herceptin® + Taxol®: Die Partner des neuen Therapiestandards Band 114, Zuckschwerdt, München
- Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, Schnitt SJ, Gown AM (2001)  
Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis  
Am J Clin Pathol 115:814-822

Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y (1998)  
C-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor  
Genes Dev 12:3663-3674

Leyland-Jones B (2001)  
Maximizing the response to Herceptin® therapy through optimal use and patient selection  
Anti-Cancer Drugs 12 (suppl 4):11-S17

Lohrisch C, Piccart M (2001)  
An overview of HER2  
Semin Oncol 28 (suppl 18):3-11

Loring P, Cummins R, O'Grady A, et al (2005)  
HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization  
Appl Immunohistochem Mol Morphol 13:194-200

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

Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al (2005)  
Polysomie 17 in HER2 status elaboration in breast cancer: effect on daily practice.  
Clin Cancer Res 11:4393-4399

Madrid M, Lo R (2004)  
Chromogenic in situ hybridisation (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER2 status  
Breast cancer Res 6:R593-R600

Mass RD, Sanders C, Charlene K, Johnson L, Everett T, Anderson S (2000)  
The concordance between the clinical trial assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization in the Herceptin pivotal trials  
Proc Am Soc Clin Oncol 19:75a (abstract 291)

McGuire WL (1991)  
Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines.  
J Natl Cancer Inst 83:154-155

McKeage K and Perry CM (2002)  
Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2  
Drugs 62, 209-243

- Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F (1997)  
Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms  
*Cancer Res* 57(13):2765-2780
- Mokbel K, Hassanally D (2001)  
From HER2 to Herceptin  
*Curr Med Res Opinion* 17:51-59
- Molina R, Ciocca DR, Tandon AK, Allred DC, Clark GM, Chamness GC, Gullick WJ, McGuire WL (1992)  
Expression of HER-2/*neu* oncoprotein in breast cancer: a comparison of immunohistochemical and western blot techniques.  
*Anticancer Res* 12:1965-1991
- Müller V, Witzel I, Lück HJ, Köhler G, von Minckwitz G, Möbus V, Sattler D, Wilczak W, Löning T, Jänicke F, Pantel K, Thomssen C (2004)  
Prognostic and predictive impact of the HER-2/*neu* extracellular domain (ECD) in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer  
*Breast Cancer Res Treat* 86:9-18
- Neyt MJ, Albrecht JA, Clarysse B, et al (2005)  
Cost-effectiveness of Herceptin: a standart cost model for breast-cancer treatment in a Belgian university hospital  
*Int J Technol Assess Health Care* 21:132-137
- Noack F, Krüger S, Hofmann M, Ortmann O (2003)  
HER-2 Diagnostics in Breast Cancer: Current Methods and Future Perspectives  
*Geburtsh Frauenheilk* 63:1119-1126
- Nyagol J, Nyong'o A, Byakika B, Muchiri L, Cocco M, de Santi MM, Spina D, Bellan C, Lazzi S, Kostopoulos I, Luzi P, Leoncini L (2006)  
Routine assessment of hormonal receptor and her-2/*neu* status underscores the need for more therapeutic targets in Kenyan women with breast cancer  
*Anal Quant Cytol Histol* 28(2):97-103
- O'Malley FP, Parkes R, Latta E, Tjan S, Zadro T, Mueller R, Arneson N, Blackstein M, Andrulis I (2001)  
Comparison of HER2/*neu* status assessed by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry  
*Am J Clin Pathol* 115:504-511
- Onody P, Bertrand F, Muzeau F, Bieche I, Lidereau R (2001)  
Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical assays for HER-2/*neu* status determination: Application to node-negative breast cancer  
*Arch Pathol Lab Med* 125:746-750
- Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N (2006)

Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer

J Clin Oncol 24:3726–3734

Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY (2003)

Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2 status in primary breast carcinoma using tissue microarray

Mod Pathol 26: 937-943

Passarge E (2001)

Genetik, 3-54

In: Siegenthaler W: Klinische Pathophysiologie;

8. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York

Pasternak K (1997)

Monoklonale Antikörpertechnik, 145-194

In: Ganten D, Ruckpaul K: Molekular- und Zellbiologische Grundlagen;

1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, Ramos L, Peng HJ, Seshadri R, Slamon DJ (2000)

Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry

J Clin Oncol 18:3651-3664

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ (1996)

Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization.

Oncogene 13:63-72

Pegram MD, Baly D, Wirth C, Gilkerson E, Slamon DJ, Sliwkowski MX, Bauer K, Fox JA (1997)

Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity in breast cancer patients in phase III clinical studies of a humanized anti-HER2 antibody

Proc Am Assoc Cancer Res 38:602: abstr 4044

Pegram MD, Slamon DJ (2000)

Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy

Semin Oncol 27 (suppl 9):13-19

Perez E, Roche P, Jenkins R, Reynolds C, Halling K, Ingle J, Wold LE (2002)

HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation with weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization

Mayo Clin Proc 77:148-154

Perez E, Suman V, Davidson N, et al (2005)

Exploratory analysis from NCCTG N9831: Do clinical and laboratory characteristics predict cardiac toxicity of Trastuzumab when administered as a component of adjuvant therapy?

Breast Cancer Res Treat 94 (supp 1): abstr 2038

Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, Wong

EY, Yang SJ, Masood S (2000)

Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection HER2-neu amplification in breast cancer:  
A multicenter portability study

Ann Clin Lab Sci 30:41-48

Persons DL, Tubbs RR, Cooley LD, et al (2006)

HER-2 fluorescence in situ hybridization: Results from the survey program of the College of  
American Pathologists

Arch Pathol Lab Med 130:325-331

Piccart-Gebhart M, Procter M, Leyland-Jones B, et al. (2005)

Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer

N Engl J Med 353:1659-1672

Piccart M, Lohrisch C, a. Di Leo, Larsimont D (2001)

The predictive value of HER2 in breast cancer

Oncol.61 (suppl2):73-82

Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR (2005)

Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer

Breast J. 11(6):433-439

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G,  
Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR,  
Flom KJ (1997)

HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization:

Poor prognosis in node-negative breast carcinomas

J Clin Oncol 15:2894-2904

Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J,  
Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, Paterson MC, Slamon DJ (1993)

HER2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized  
image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease.

Cancer Res 53:4960-4970

Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W,  
Slamon DJ (1994)

Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland:

Correlation with poor prognosis

Cancer Res 4:5675-5682

Press MF, Slamon D, Flom K, Park J, Zhou J, Bernstein L (2002)

Evaluation of HER2 gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay  
methods in molecularly characterized cohort of breast cancer specimens

J Clin Oncol 20:3095-3105

Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN (2006)

HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant Chemotherapy

N Engl J Med 354:2103-2111

Popescu NC, King CR, Kraus MH (1989)

Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-  
21.32

Genomics 4:362-366



- Rajkumar T, Gullick WJ (1994)  
The type I growth factor receptors in human breast cancer  
Breast Cancer Res Treat 29:3-9
- Reis-Filho J, Tutt A (2008)  
Triple negative tumors: a critical review  
Histopathology 52:108-118
- Revillion F, Bonterre J, Peyrat JP (1998)  
ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance  
Eur J Cancer 34:791-808
- Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM (2000)  
HER-2/neu testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and  
fluorescence in situ hybridization approach  
Mod Pathol 13:866-873
- Riese DJ, Stern DF (1998)  
Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network  
Bioessays 20:41-48
- Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, et al (2002)  
Concordance between local and central laboratory HER2 testing in breast intergroup trial N9831  
J Natl Cancer Inst 94:855-857
- Romond E, Perez E, Bryant J, et al (2005)  
Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.  
N Engl J Med 353:1673-1684
- Ross JS, Fletcher JA (1999)  
HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer  
Am J Clin Pathol 112 (suppl 1):S53-S67
- Rubin I and Yarden Y (2001)  
The basic biology of HER2  
Ann Oncol 12 (suppl 1):3-8
- Saez A, Andreu FJ, Segui MA, Bare ML, Fernandez S, Dinares C, Rey M (2006)  
HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with  
fluorescence in situ Hybridisation (FISH) in breast cancer – A study of two hundred cases  
The Breast 15:519-527
- Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, et al. (2003)  
Which breast carcinomas need HER2 gene study after immunohistochemical analysis? Results of  
combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains  
Histopathology 43:354-362
- Sauer H (2007)  
Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage 2007,  
Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984)

The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen  
Nature 312:513-516

Seidman AD, Fornier MN, Estava FJ, et al (2001)

Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification  
J Clin Oncol 19:2587-2595

Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P (1993)

Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer  
The South Australian Breast Cancer Study Group  
J Clin Oncol 11:1936-1942

Shak S (1999)

Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group  
Semin Oncol 6:71-77

Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC, Fendly BM, Maneval D, Mordenti J, Figari I, Kotts CE, Palladino MA Jr, Ullrich A, Slamon DJ (1991)

Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic  
J Clin Immunol 11:117-127

Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA (1981)

Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts  
Nature 290:261-264

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987)

Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene  
Science, 235:177-182

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press M (1989)

Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer  
Science, 244:707-712

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001)

Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2  
N Engl J Med 344:783-792

Slamon DJ, Pegram MD (2001)

Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials  
Semin Oncol, 28 (suppl 3):13-19

Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA (1999)  
Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)  
Semin Oncol 26 (suppl 12):60-70

Statistisches Bundesamt (2006)  
Todesursachen in Deutschland 2005 (Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4).  
<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab19.php>

Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986)  
p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor-like protein associated with tyrosine  
kinase activity  
Mol Cell Biol 6:1729-1740

Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, et al (2005)  
Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and  
cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in  
node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP  
B-31  
J Clin Oncol 23:7811-7819

Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J (2000)  
Chromogenic in situ hybridization: A practical alternative for fluorescence in situ hybridization  
to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples  
Am J Pathol 157:1467-1472

Tedesco K, Thor A, Johnson D, et al. (2004)  
Doxetacel combined with Trastuzumab is an active regimen in HER2 3+ overexpressing and  
fluorescent in situ hybridization-positiv metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II  
trial  
J Clin Onkol 22:1071-7

Thomson T, Hayes M, Spinelli J, et al. (2001)  
HER2 in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with  
4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization  
Mod Pathol 14:1079-1086

Tsuda H, Sasano H, Akiyama F, et al. (2002)  
Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER2  
expression detected by HercepTest, Nicherei polyclonal antibody, cb11 and TAB250 in breast  
carcinoma  
Pathol Int 52:126-134

Tubbs R, Pettay J, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM (2001)  
Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy:  
Apparent immunohistochemical false-positives do not get the message  
J Clin Oncol, 19:2714-2721

Tubbs R, Pettay J, Skacel M, Hicks D, Mele J, Powell R, Chen T, Nita H, Grogan T, Hainfeld J (2003)

Automated chromogenic in situ hybridization (CISH) for detection of HER2 gene amplification  
USACAP (poster 17)

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

UICC (Union international contre le cancer) (2002)

TNM classification of malignant tumours

Wiley-Liss, Inc. New York

van de Vijver MJ, Petersen JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R (1988)

*Neu*-Protein overexpression in breast cancer: Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer.

New Engl J Med 319:1239-1245

van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, Rüschoff J (2007)

Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study.

Breast Cancer Res 5:R68

Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA (2004)

Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer

Arch Pathol Lab Med 128:627-633

Vogel C, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ (2001)

First-line, single-agent Herceptin (trastuzumab) in metastatic breast cancer

A preliminary report

Eur J Cancer 37 (suppl 1):S25-S29

Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R (2000)

Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens:

Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays

J Clin Pathol 53:374-381

Wittekind C, Wagner G (Hrsg.) (1997)

UICC (International union against cancer)

TNM-Klassifikation maligner Tumoren

Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Auflage

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer J Clin Oncol 1:118-45.

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

Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. (2004)  
HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods  
JAMA 291:1972-1977

Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z (2002)  
Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma  
Mod Pathol 15:657-665

Zia A, Schildberg FW, Funke I (2001)  
MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients  
Int J Cancer 93:566-570

## VIII. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

κ: Kappa

Abb.: Abbildung

ABC: Avidin-Biotin-Komplex

Aqua dest.: Aqua destillata

°C: Grad Celcius

CEP: Chromosome enumeration DNA probe

CISH: Chromogen in situ Hybridisierung

CMF: Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil

DAB: Diaminobenzidin

DAPI: 4,6-Diamidino-2-phenylindol

DCIS: duktales Carcinoma in situ

DIG: Digoxigenin

DNA: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ER: Östrogenrezeptor

F(ab): fragment antigen binding (Antigenbindendes Fragment)

Fc: fragment crystalline (kristallines Fragment)

FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FITC: Fluoreszeinisothiocyanat (Grünfilter des Fluoreszenz-Mikroskops)

G: Grading (Differenzierungsgrad des Tumorgewebes)

h: hora (Stunde)

HB-EGF: Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor

H&E: Hämalaun-Eosin

HER: human epidermal growth factor receptor (Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) *Synonym*: HER-2/neu; c-erbB2

HER2-ECD: human epidermal growth factor receptor2 - extracellular domain

HRP: horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidas)

Ig: Immunglobulin

IHC: Immunhistochemie

ISH: in situ Hybridisierung

kb: kilobasen

kD: kilodalton

LCIS: lobuläres Carcinoma in situ

LSI: Locus specific identifier

mg: Milligramm

MHC: major histocompatibility complex

min: Minute

ml: Milliliter

μl: Mikroliter

μm: Mikrometer

mRNA: messenger ribonucleic acid (messenger-Ribonukleinsäure)

n: numerus (Gesamtanzahl Fälle)

NP-40: Nonylphenyl-polyethylenglycol-40

NPV: negative predictive value (negative prädikiver Wert)

NRG: Neuregulin

PBS: Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen (proliferierendes Zellkern Antigen)

PCR: polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)

pH: potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)

PPV: positive predictive value (positiv prädiktiver Wert)

PR: Progesteronrezeptor

p-Wert: Überschreitungswahrscheinlichkeit

RNA: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion)

SD: Standardabweichung

SSC: standard saline citrate (Natriumchlorid / Natriumcitrat)

Tab.: Tabelle

TGF $\alpha$ : transforming growth factor  $\alpha$

TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat (Rotfilter des Fluoreszenz-Mikroskops)

TNM: Klassifikation von der International Union Against Cancer (UICC) festgelegte

Tumorstadieneinteilung nach der klinisch und histopathologisch bestimmten anatomischen

Ausdehnung eines Tumors aufgrund folgender Kriterien: Größe und Ausdehnung des

Primärtumors (T), Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und

Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (M)

uPA: Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp

WHO: World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)



## **2. Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Kriterien für die Implementierung prognostischer Faktoren (modifiziert nach McGuire, 1991)

**Tabelle 2:** Nachweisverfahren für HER2

**Tabelle 3:** DAKO-Score

**Tabelle 4:** Auswertungskriterien nach Angaben des Herstellers (Vysis-Ratio)

**Tabelle 5:** Auswertungskriterien nach Angaben des Herstellers (Zymed)

**Tabelle 6:** Polyploide Fälle

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Immunhistochemie: DAKO-Score 0 - 3+

**Tabelle 8:** Pathomorphologische Daten der Studienpatientinnen

**Tabelle 9:** Tumorgröße (pT) vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

**Tabelle 10:** Grading vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

**Tabelle 11:** Hormonrezeptorstatus (Östrogen und Progesteron) vs. FISH (HER2/CEP17Ratio)

**Tabelle 12:** HER2 und histologischer Tumortyp

**Tabelle 13:** CISH vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

**Tabelle 14:** CISH vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)  
mit KAPPA SCORE OF AGREEMENT  $K=0.886$

**Tabelle 15:** Überblick über die in FISH und CISH diskordanten Fälle

**Tabelle 16:** IHC (DAKO-Score) vs. FISH (HER2/CEP17-Ratio)

**Tabelle 17:** Prozentuale Verteilung der FISH-Ergebnisse in den einzelnen IHC-Kategorien

**Tabelle 18:** IHC (DAKO-Score) vs. CISH

**Tabelle 19:** Prozentuale Verteilung der CISH-Ergebnisse in den einzelnen IHC-Kategorie

**Tabelle 20:** Vor- und Nachteile der Hybridisierungs-Techniken FISH und CISH

**Tabelle 21:** Übersicht vorheriger Studien zum Vergleich von FISH und CISH

### 3. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Klasse I der Wachstumsfaktor-Rezeptoren

**Abbildung 2:** HER2 Test-Algorithmus (modifiziert nach Bilous et al., 2003)

**Abbildung 3:** Avidin-Biotin Komplex Methode

**Abbildung 4:** (A-D): Immunhistochemische Färbung (DAKO-Score 0 - 3+)

**Abbildung 5:** FISH-Loci

**Abbildung 6:** CISH-Methodik, Polymer Nachweis-Kit, Firma Zymed

**Abbildung 7:** Beispiele und Richtlinien zum Auszählen der Signale in Anlehnung an die Empfehlungen der Firma Vysis: ●= HER2-Gensignal, ○= CEP 17-Zentromersignal

**Abbildung 8:** Dokumentations-Tabelle

**Abbildung 9:** (A-E): HER2-Status in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen. Färbung mittels Pathvision HER2 DNA Sonden-Kit. Genlokus von HER2: Rote Signale; Genlokus des Zentromerbereich von Chromosom 17 (CEP17): Grüne Signale

- C) Normaler HER2-Status mit je zwei Signalen für HER2 und CEP17 (FISH-Ratio:1)
- D) Amplifikation mit einer FISH-Ratio von  $\geq 2,2$
- E) Amplifikation mit Clustern
- F) Polyploidie mit  $\geq 3$  Chromosom 17-/HER2-Signalen und FISH-Ratio von  $\leq 1$

**Abbildung 10a:** FISH Vysis Ratio: Kategorien (n=100)  
Kategorien:  $<1.8$ = nicht amplifiziert;  $1.8-2.2$ = fraglich amplifiziert;  
 $>2.2$ =amplifiziert

**Abbildung 10b:** Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin

**Abbildung 11:** (A-C): HER2-Status in exemplarisch dokumentierten Tumorzellkernen. Färbung mittels Zymed Spot-Light HER2 CISH-Kit. Genlokus von HER2: braune Signale

- B) und B) Normaler HER2-Status mit je zwei HER2-Signalen pro Zellkern
- C) Cluster der HER2-Signale: Indikativ für eine HER2-Genamplifikation

**Abbildung 12a:** CISH: Kategorien (n=100)  
Kategorien: 1-6 = nicht amplifiziert; 6-10 = schwach amplifiziert;  
 $>10$  = amplifiziert

**Abbildung 12b:** Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER2-Signale pro Patientin

**Abbildung 13:** Seit Januar 2008 zugelassenes CISH-Kit zur simultanen HER2 /CEP17-Analyse

### **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 der Promotion beworben habe.

Susanne Thon