

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. Andreas Marx

Homogenität der *HER2*-Amplifikation
in
Adenokarzinomen des Magens

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lars Oliver Rainer Tharun
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

05.03.2010

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg am:

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. A. Lohse

Meinen Eltern.

Elisabeth Maria und Dr. med. Rainer Karl-John Tharun

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	ii
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Das Adenokarzinom des Magens	1
1.2 Konventionelle Therapie	3
1.3 Zielgerichtete Therapie mittels HER2	4
2 Arbeitshypothese und Fragestellung	8
3 Material und Methoden	10
3.1 Übersicht	10
3.2 Patientenkollektive	11
3.3 TMA-Herstellung	13
3.4 Immunhistochemie	16
3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	17
3.6 Statistik	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Technische Aspekte	19
4.2 HER2-Immunhistochemie	19
4.3 <i>HER2</i> -Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	19
4.4 Vergleich der HER2-Positivitätsdiagnostik mittels FISH und Immunhistochemie	22
4.5 HER2-Homogenitätsanalyse an TMA-spots	22
4.6 Großflächenuntersuchung	23
4.7 <i>Topoisomerase IIα</i> -FISH	23
5 Diskussion	24
6 Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	iv
Danksagung	xvi
Lebenslauf	xvii
Eidesstattliche Versicherung	xviii

Abkürzungsverzeichnis

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor Receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HB-EGF	Heparin-bindender EGF
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
<i>HER2</i>	<i>ERBB2 Gen</i>
IHC	Immunhistochemie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
TGF α	Transforming growth factor-a
TMA	Tissue Micro Array
<i>TOP2A</i>	DNA Topoisomerase II, alpha Isozym Gen (Topoisomerase II α)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 3-1	Übersicht über die Untersuchungsschritte	10
Abbildung 3-2	Herstellung eines <i>Tissue Micro Arrays</i>	13
Abbildung 3-3	TMA-Schnitt (HE-Färbung)	14
Abbildung 3-4	HE- und HER2-Färbung (3+) eines TMA- <i>spots</i>	16
Abbildung 3-5	Hohe Amplifikationen von HER2 und Topoisomerase II α (TOP2A) in Magenkarzinom-Arealen.....	18
Abbildung 4-1	Vergleich der HER2-Expression mit der <i>HER2</i> -Amplifikation..	22

Tabellen

Tabelle 1-1	HER2-Positivität in Magenkarzinomen.....	6
Tabelle 3-1	Standard-Kontrollgewebe.....	15
Tabelle 4-1	FISH-Ergebnisse der <i>HER2</i> -amplifizierten TMA- <i>spots</i> und dazugehörige immunhistochemische Ergebnisse	20
Tabelle 4-2	Klinische Parameter und HER2-Status	21
Tabelle 4-3	Vergleich des HER2-Status zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen	23
Tabelle 4-4	Großflächenuntersuchung in 8 HER2-positiven Fällen.	23

1 Einleitung

1.1 Das Adenokarzinom des Magens

Das Adenokarzinom des Magens ist noch immer die zweithäufigste Krebstodesursache weltweit (Brenner u. a. 2009). Insbesondere in vielen asiatischen und Schwellenländern zählt das Magenkarzinom zu den häufigsten Krebsarten (Fuchs & Mayer 1995; Matsuzaka u. a. 2007). Einer altersstandardisierten Inzidenz von 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern in Deutschland steht in Ostasien eine Neuerkrankungsrate von bis zu 62 pro 100.000 Einwohnern gegenüber (GLOBOCAN 2002). Diese weltweiten Unterschiede in der Häufigkeit des Magenkarzinoms sind möglicherweise auch in der unterschiedlichen Virulenz von regional dominierenden *Helicobacter pylori*-Stämmen begründet (Yamaoka u. a. 2008).

Neben einer solchen bakteriell bedingten Entzündungsreaktion können auch chronische chemische Reizzustände, insbesondere durch Alkohol- und Tabakkonsum, durch duodenalen Reflux sowie durch die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika zur Entstehung einer chronisch atrophischen Gastritis und zur Ausbildung einer intestinalen Metaplasie führen (Parl u. a. 1979; Sobala u. a. 1993; El-Zimaity u. a. 1996). Eine weitere Ursache dieser präkanzerösen Magenschleimhautalterationen stellen autoimmunbedingte Gastritiden auf dem Boden einer Autoantikörperreaktion gegen die Protonenpumpe der Belegzellen dar (Toh u. a. 1992). Seltener können Magenulzera, adenomatöse Polypen, der Morbus Menétrier und ein Zustand nach Magenteilresektion die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen (Hsu u. a. 1991; Cristallini u. a. 1992; Zhang 2007; Nunobe u. a. 2008).

Die im letzten Jahrhundert in vielen westlichen Ländern zu beobachtende Abnahme der Magenkarzinom-Inzidenz (Terry u. a. 2002) wird einer Verbesserung der für die Pathogenese des Magenkarzinoms maßgeblichen ökologischen Faktoren zugeschrieben (Neugut u. a. 1996). Hierzu werden die im Verlauf des 20. Jahrhunderts gesunkene Nitrataufnahme durch gesündere Konservierungsmethoden, die gestiegene Obst- und Gemüse-Verfügbarkeit

(Coggon u. a. 1989) sowie gestiegene Hygienestandards und eine aufgrund dessen niedrigere *Helicobacter pylori*-Durchseuchungsrate gezählt (Brown 2000).

Die Adenokarzinome des Magens werden nach ihrem Wachstumsmuster in einen intestinalen Typ (53%), einen diffusen Typ (33%) sowie einen Mischtyp kategorisiert (Lauren 1965). Insbesondere der intestinale Typ der Magenkarzinome scheint in der Karzinogenese schädlichen Umwelteinflüssen gegenüber sensibel zu sein (Solcia u. a. 1996); so hat der Anteil der intestinalen im Verhältnis zum Anteil der diffusen Magenkarzinome im letzten Jahrhundert in den westlichen Ländern stetig abgenommen (Henson u. a. 2004).

Ein weiteres differenzierendes Merkmal des diffusen Magenkarzinoms ist seine Neigung früher lymphogen und ausgedehnter hämatogen zu metastasieren als der intestinale Typ (Esaki u. a. 1990). Die Leber, die Lunge, das Skelett und das Gehirn sind die häufigsten Lokalisationen von Fernmetastasen. Per continuitatem infiltrieren Magenkarzinome neben dem Omentum, dem Kolon, dem Pankreas und der Milz je nach Primärlokalisierung im Magen auch den Ösophagus oder das Duodenum. Kavitäre und Abtropfmetastasen manifestieren sich als Peritonealkarzinose bzw. ovarial (Krukenbergscher Tumor) und im Douglas-Raum. Trotz dieser ausgedehnten Ausbreitungswege wird das Magenkarzinom erst spät symptomatisch und äußert sich dann überwiegend in Dysphagie, Inappetenz und Gewichtsverlust.

Da das Adenokarzinom des Magens am häufigsten um das 70. Lebensjahr auftritt wird es aufgrund des demographischen Wandels in Deutschland auch in Zukunft ein Krankheitsbild von großer medizinischer Bedeutung bleiben (Ferlay u. a. 2007; Fuchs & Mayer 1995).

1.2 Konventionelle Therapie

Die Operation ist die erfolgsversprechendste Therapie des Magenkarzinoms. Das Erreichen einer R0-Resektion, d.h. das mikroskopisch beurteilt vollständige operative Entfernen des gesamten Tumorgewebes, bildet somit im kurativen Ansatz die wichtigste Grundlage für den weiteren Verlauf. Allerdings kann eine solche R0-Resektion nur bei 30% der Patienten erreicht werden. Bei mehr als 40% der Patienten stellt sich das Karzinom bereits bei Diagnosestellung oder intraoperativ als inoperabel dar und bei den übrigen 25% sind in der nachfolgenden mikroskopischen Untersuchung positive Präparateränder zu finden (Rubin & Williams 2000).

Für die meisten Patienten ist damit eine systemische Chemotherapie die wichtigste Therapieoption. Verschiedene Einzel- und Kombinationswirkstoffe werden in der Therapie inoperabler Magenkarzinome eingesetzt. Wichtige konventionelle Chemotherapeutika bei Magenkarzinomen sind die Anthrazykline (Wagner u. a. 2006). Der Wirkmechanismus der Anthrazykline besteht in der DNA-Interkalation und Bindung des Topoisomerase II α -Enzyms, welches die DNA-Topologie während der Transkription kontrolliert (Dall'Acqua u. a. 1974). Das *Topoisomerase II α -Gen (TOP2A)* liegt in direkter Nachbarschaft zum *HER2-Gen* auf dem Genlokus 17q21 und Koamplifikationen dieser beiden Gene sind häufig (Mano u. a. 2007; Hicks u. a. 2005). Neben den Anthrazyklinen zählen Platinverbindungen, Fluoropyrimidine und neuerdings Taxane und Irinotecan zu den gebräuchlichsten Therapeutika. Objektive Ansprechraten liegen zwischen 10 und 30% für Einzelwirkstoffe und zwischen 30 und 60% für Kombinationsregime (Sastre u. a. 2006).

Die kumulierten relativen 5-Jahres-Überlebensraten bei Magenkarzinomen sind im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen für Männer wie für Frauen weiterhin schlecht und liegen bei 35% bzw. 31% (RKI 2008). Neue Therapieansätze werden daher dringend benötigt.

1.3 Zielgerichtete Therapie mittels HER2

Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen von Tumoren hat zur Entwicklung von Wirkstoffen beigetragen, die zielgerichtet in zelluläre Signalkaskaden eingreifen und so direkt Zelldifferenzierungs-, -proliferations-, und -überlebensprozesse beeinflussen können.

Das HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*)-Protein ist ein transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor und ein Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR), die aus den Proteinen HER1-HER4 besteht. Das HER2-Protein wird von einem Gen auf dem Chromosom 17q21 kodiert (Akiyama u. a. 1986). Dieses *HER2*-Gen liegt direkt benachbart zu den Topoisomerase II α -Genen, den Ansatzpunkten der Anthrazykline, einer wichtigen konventionellen Chemotherapeutika-Gruppe in der Therapie des Magenkarzinoms.

Das HER2-Protein besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer kurzen transmembranösen sowie einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Als Liganden der HER-Rezeptoren fungieren Wachstumsfaktoren (EGF, HB-EGF, TGF α), Reguline (Neureguline, Amphiregulin, Epiregulin) und Betacellulin. Die Bindung dieser Liganden induziert die Homo- und Heterodimerisierung der EGFR-Mitglieder untereinander. Der bevorzugte Heterodimerisierungspartner für die anderen Mitglieder und damit zentraler Bestandteil der HER-Signalkaskaden ist das HER2-Protein. HER2 scheint in Ermangelung eigener Liganden ausschließlich durch eine solche Heterodimerisierung aktiviert zu werden. Die Dimerisierung führt insbesondere zu einer Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalwegs, der eine Inhibierung von Apoptose-vermittelnden Transkriptionsfaktoren zur Folge hat und damit das Überleben der Zelle unterstützt. Weitere Signalkaskaden werden über die HER-vermittelte Induktion der GTPasen RAS und RAC initiiert, deren Effekte die Förderung der Zellbeweglichkeit und -proliferation beinhalten (Hudziak u. a. 1987; Lee u. a. 1989; Valabrega u. a. 2007).

In Karzinomen fungiert *HER2* als Onkogen, da es über eine Amplifikation zu einer Überexpression des HER2-Proteins führt und damit der Tumorzelle durch eine vermehrte Aktivierung der beschriebenen Signalkaskaden Wachstumsvorteile verschafft (Slamon u. a. 1989). In Mammakarzinomen liegt in etwa einem Fünftel der Fälle eine HER2-Positivität vor (Berns u. a. 1992). Diese ist mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemo- und Hormontherapie sowie mit einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert (Slamon u. a. 1987; Kaptain u. a. 2001).

Trastuzumab (HerceptinTM, Genentech Inc., South San Francisco, CA, USA) ist ein humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper der direkt an die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors bindet (Carter u. a. 1992). Die Fc-Domäne des an HER2 gebundenen Trastuzumab-Antikörpers wird vom Fc-Rezeptor Natürlicher Killerzellen erkannt, wodurch die Lyse der Trastuzumab-markierten Zelle induziert wird (Cooley u. a. 1999). Neben dieser cytotoxischen hat Trastuzumab auch eine cytostatische Wirkung. Über Interaktionen mit intrazellulären Proteinen hat Trastuzumab eine Schwächung der HER-vermittelten Signalwege, insbesondere der PI3K-Signalkaskade zur Folge (Delord u. a. 2005). Darüber hinaus führt Trastuzumab zu einer Hemmung der Tumor-Angiogenese (Petit u. a. 1997).

Trastuzumab verbessert die Überlebensraten bei HER2-positiven Mammakarzinomen (Slamon u. a. 2001; Smith u. a. 2007; Tripathy u. a. 2004; Tuma 2005; Baselga u. a. 1999), insbesondere bei Karzinomen die nicht nur eine HER2-Überexpression sondern auch eine *HER2*-Amplifikation zeigen (Mass u. a. 2005). Der erfolgreiche Einsatz von Trastuzumab bei Mammakarzinomen hat dazu geführt, dass der Einsatz auch bei anderen HER2-positiven Tumoren untersucht wird. Inzwischen werden HER2-Alterationen in der Entwicklung vieler verschiedener Tumorentitäten eine Rolle zugeschrieben und sind in vielen davon gleichermaßen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Normanno u. a. 2005; Hynes & Lane 2005). Eine HER2-Überexpression bzw. -*HER2*-Amplifikation wurde bereits für Lungen- (Hirashima u. a. 2001), Blasen- (Sauter u. a. 1993), Ovarial- (McKenzie u. a. 1993), Endometrium- (Hetzl u. a. 1992), Zervix- (Mitra u. a. 1994),

Ösophagus- (al-Kasspooles u. a. 1993), Kolon- (D'Emilia u. a. 1989) sowie Magenkarzinome beschrieben.

Die Häufigkeit einer immunhistochemisch bestimmten HER2-Positivität in Magenkarzinomen reicht in den Ergebnissen früherer Studien von 7% bis 34% (Tabelle 1-1).

No.	Referenz	Anzahl der Patienten	HER2-Positivität
			IHC 3+
1	(Lee u. a. 2003)	841	17,0%
2	(Ooi u. a. 1998)	396	10,1%
3	(Takehana u. a. 2002)	352	6,8% (FISH: 7,1%)
4	(Yano u. a. 2006)	200	23,0% (FISH: 27,1%)
5	(Allgayer u. a. 2000)	189	11,6%
6	(Pinto-de-Sousa u. a. 2002)	157	15,3%
7	(Sanz-Ortega u. a. 2000)	143	31,0%
8	(Ougolkov u. a. 2000)	116	16,3%
9	(Risio u. a. 2003)	72	15,2% (FISH: 15,3%)
10	(Dursun u. a. 1999)	62	17,7%
11	(Koeppen u. a. 2001)	62	8,1%
12	(Ougolkov u. a. 2003)	56	26,8%
13	(Gürel u. a. 1999)	55	10,9%
14	(Aoyagi u. a. 2001)	50	34,0%
		Gesamt: 2751	17,4%

Tabelle 1-1 HER2-Positivität in Magenkarzinomen. Abkürzungen: IHC (Immunhistochemie); FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung).

Eine *HER2*-Amplifikation scheint auch in Magenkarzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein. Eine Studie ergab, dass die mediane Überlebenszeit von Patienten mit HER2-positiven Magenkarzinomen nur halb so lang war wie die von Patienten mit HER2-negativen Magenkarzinomen (6,6 Monate vs. 12,7 Monate; $p=0,37$; (Tanner u. a. 2005)). Eine wichtige Rolle von HER2 für die Progression des Magenkarzinoms wäre ein weiteres Argument dafür, dass Magenkarzinom-Patienten mit einem HER2-positiven Tumor von einer Trastuzumab-Therapie profitieren könnten.

Einzelfallstudien berichteten tatsächlich von ersten Erfolgen einer Trastuzumab-Therapie an Patienten mit HER2-positiven Magenkarzinomen; so wurde bei einer Patientin mit multiplen abdominellen Metastasen eines Magenkarzinoms mit einer Trastuzumab/Oxaliplatin-Kombination ein vollständiges Ansprechen erreicht und dieses unter Trastuzumab-Monotherapie über 18 Monate stabilisiert (Rebischung u. a. 2005). Ein vergleichbar deutlicher Antitumor-Effekt konnte auch bei einem Magenkarzinompatienten mit einer rasch progredienten Lebermetastasierung erzielt werden (Inui u. a. 2006).

Inzwischen untersuchen bereits drei klinische Studien die Ergänzung von Trastuzumab zur Chemotherapie bei Patienten mit Magenkarzinomen. Zwei Phase II Studien überprüfen die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Trastuzumab/Cisplatin- (Cortes-Funes u. a. 2007), bzw. einer Trastuzumab/Cisplatin/Docetaxel-Kombination (Nicholas u. a. 2006). Vorläufige Ergebnisse der Trastuzumab/Cisplatin-Kombinationsstudie zeigen ein Ansprechen in 6 (35%) von 17 Patienten. Die erste Studie der Phase III wird zurzeit an 3807 Magenkarzinom-Patienten weltweit durchgeführt (ToGA study; Protocol number: BO18255). In dieser soll die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Chemotherapie-Trastuzumab-Kombination mit der einer alleinigen Gabe einer Chemotherapie verglichen werden. Zwischenergebnisse nach einem medianen *follow-up*-Zeitraum von 17,1 Monaten zeigen einen signifikant verlängerten medianen Überlebenszeitraum von Patienten, die eine Kombination aus einer Chemotherapie und Trastuzumab erhielten, gegenüber Patienten die ausschließlich mit einer Chemotherapie behandelt wurden (13,5 vs. 11,1 Monate; $p=0.0048$) (Van Cutsem u. a. 2009).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

In Mammakarzinomen besteht eine ausgeprägte Homogenität der *HER2*-Amplifikation innerhalb des Primärtumors sowie in den Metastasen (Simon u. a. 2001). Hierin könnte eine wesentliche Grundlage für das hohe therapeutische Ansprechen dieser Tumoren auf eine Trastuzumab-Therapie bestehen. In welchem Maße eine entsprechende Homogenität auch in Nicht-Mammakarzinomen zu finden ist, ist weitgehend unklar. In Blasenkrebs ist die *HER2*-Amplifikation beispielsweise wesentlich heterogener (Sauter u. a. 1993). Eine derartige Heterogenität der Zielprotein-Expression innerhalb eines Primärtumors sowie zwischen Primärtumor und Metastasen könnte eine zielgerichtete Antitumorthherapie erheblich beeinträchtigen.

Zur *HER2*-Statusbestimmung in der klinischen Praxis wird üblicherweise lediglich der Primärtumor molekularpathologisch untersucht. Eine ausgeprägte Heterogenität der *HER2*-Amplifikation in Magenkarzinomen ließe es nicht zu, aus dieser Primärtumoranalyse Rückschlüsse auf den anzunehmenden *HER2*-Status der zu behandelnden Metastasen zu ziehen. Das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie ließe sich somit weder bei *HER2*-positiven noch bei *HER2*-negativen Primärtumoren verlässlich prognostizieren.

Um die potenzielle Anwendbarkeit von Trastuzumab bei Adenokarzinomen des Magens einschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Adenokarzinome des Magens und dazugehörige Lymphknotenmetastasen auf das Vorliegen einer *HER2*-Amplifikation und -Überexpression hin untersucht und die Ergebnisse statistisch in Beziehung zu klinischen Parametern gesetzt. Darüber hinaus wurde das *HER2*-Amplifikationsmuster in *HER2*-positiven Adenokarzinomen des Magens systematisch analysiert. Hierzu wurde die Homogenität der *HER2*-Amplifikation innerhalb der Primärtumoren sowie zwischen Primärtumoren und Metastasen begutachtet.

Bei Mammakarzinomen werden Kombinationsbehandlungen mit einem Anthrazyklin häufig angewendet. Insbesondere bei *HER2*-positiven Mammakarzinomen können hiermit Therapieerfolge erzielt werden. Heute weiß man, dass diese Beobachtung durch die häufige Koamplifikation von *HER2* und

TOP2 α , dem Ziel der Anthrazyklintherapie, erklärt ist (Mano u. a. 2007; Hicks u. a. 2005). Problematisch ist jedoch die besonders bei kombiniertem Einsatz von Trastuzumab und Anthrazyklinen auftretende Kardiotoxizität (Rayson u. a. 2008). Eine prätherapeutische Evaluation der *HER2-TOP2A*-Koamplifikation könnte eventuell Aussagen über den zu erwartenden Therapieerfolg einer solchen Kombinationsbehandlung treffen und damit dem erhöhten Risiko der Kardiotoxizität Rechnung tragen. Um die Voraussetzungen einer Anthrazyklin-Trastuzumab-Kombinationsbehandlung in Magenkarzinomen zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Häufigkeit einer *HER2-TOP2A*-Koamplifikation in Magenkarzinomen untersucht.

Zielsetzung dieser Arbeit war es somit, die molekularen Voraussetzungen in Hinblick auf diese neuen Therapiekonzepte für Adenokarzinome des Magens zu untersuchen und mithilfe der Ergebnisse Hinweise auf die Erfolgsaussichten der Trastuzumab-Therapie für Magenkarzinom-Patienten zu gewinnen.

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht

Die einzelnen Untersuchungsschritte sind anhand der Abbildung 3-1 in Form einer Übersicht zusammengefasst. Die in der Abbildung verwendeten Kennziffern 4.1 – 4.7 korrespondieren mit den Erläuterungen im nachfolgenden Text und mit den entsprechenden Unterkapiteln im Ergebnisse-Teil dieser Arbeit.

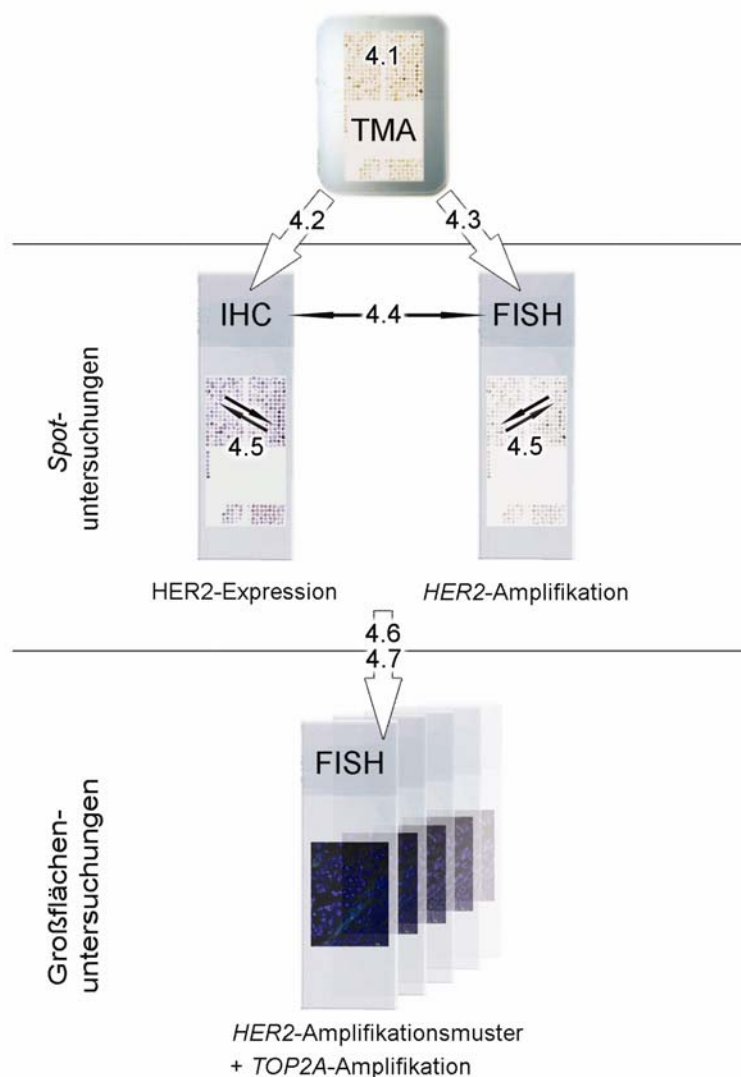


Abbildung 3-1 Übersicht über die Untersuchungsschritte. 4.1 - TMA-Erstellung; 4.2 - IHC-Färbung; 4.3 - Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; 4.4 - Vergleich der IHC-FISH-Konkordanz; 4.5 - Homogenitätsvergleich zwischen Primärtumor- und Metastasenspots; 4.6/4.7 - Großflächenuntersuchung des *HER2*- bzw. *TOP2A*-Amplifikationsmusters. *Abkürzungen:* TMA (Tissue Micro Array); IHC (Immunhistochemie); FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung); *TOP2A* (*Topoisomerase IIa*).

Aus 239 Gewebeproben eines primären Patientenkollektivs wurde ein *Tissue Micro Array* (TMA) erstellt, der eine gleichzeitige Untersuchung aller Gewebeproben auf einem Objektträger ermöglicht. Vergleiche hierzu in der Abbildung 3-1 die Kennziffer K 4.1.

Aus dem TMA wurde dann jeweils ein Schnitt für die immunhistochemische und die FISH-Analyse angefertigt. Sämtliche Gewebes $spots$ auf diesen TMA-Schnitten wurden daraufhin auf das Vorliegen einer HER2-Überexpression (K4.2) sowie einer *HER2*-Amplifikation (K4.3) hin untersucht.

Die FISH- und Immunhistochemie-Ergebnisse wurden dann miteinander verglichen um methodische Aspekte einer HER2-Analyse zu beleuchten (K4.4).

Sowohl an immunhistochemisch gefärbten als auch an FISH-TMA- $spots$ wurde die HER2-Positivität zwischen Primärtumors $spots$ und dazugehörigen Metastasens $spots$ verglichen, um erste Hinweise auf die Homogenität der HER2-Positivität zu erhalten (K4.5).

Anschließend bildeten die mithilfe des TMAs ermittelten HER2-positiven Fälle die Grundlage für die Erstellung eines zweiten Patientenkollektivs. Hierzu wurde eine Auswahl jener acht Patienten getroffen, bei denen der Zeitpunkt der Diagnosestellung am kürzesten zurücklag. Anhand aller verfügbaren Tumorgewebeproben dieser Patienten wurde dann eine Untersuchung des *HER2*-Amplifikationsmusters durchgeführt (K4.6).

Zusätzlich wurde bei jedem dieser acht Patienten mit der Untersuchung des *Topoisomerase II α* -Amplifikationsstatus noch ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt beurteilt (K4.7).

3.2 Patientenkollektive

Das Ausgangskollektiv zur Untersuchung des HER2-Status bei Magenkarzinomen umfasste neoplastisches Gewebe von 166 Patienten, die im Zeitraum von 1994 bis 2006 im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert wurden. Das mediane Alter der 49 Patientinnen und der 117 Patienten lag bei 67 Jahren, die Altersspanne reichte von 28 bis 93 Jahren.

Die primäre Auswahl des Gewebes dieser Patienten erfolgte über die Archiv-Datenbank des Instituts. Zusätzlich zu den 166 Primärtumoren wurden 69 Lymphknoten- sowie 4 Fernmetastasen dieser Tumoren in die Untersuchung miteinbezogen. Um spätere weitergehende Untersuchungen der Karzinogenese des Magenkarzinoms zu ermöglichen, wurde auf einem weiteren TMA-Block auch Normal- sowie dysplastisches Gewebe dieser Patienten in den TMA miteinbezogen. Im Rahmen dieser Arbeit fand dieser zweite TMA-Block jedoch keine weitere Verwendung.

Die aus dem Archiv zusammengetragenen Paraffin-Gewebeblöcke wurden anschließend anhand der korrespondierenden HE-Schnitte gemeinsam mit Dr. med. Andreas Marx (Oberarzt Gastroenteropathologie) erneut histopathologisch beurteilt. Hierbei wurde neben der histologischen Beschreibung und diagnostischen Einordnung die Markierung eines repräsentativen Areals für die anschließende Tissue-Micro-Array-Herstellung vorgenommen.

Die Einteilung des neoplastischen Gewebes im Zuge der Schnittsichtung erfolgte nach der Lauren-Klassifikation (Lauren 1965). Weitere Daten wurden aus den Pathologieberichten entnommen. Hierzu gehörten das pTNM-Stadium, das Grading, das UICC-Stadium sowie Angaben über die Lokalisation. Die Tumoren waren bei 45 Patienten in der Kardia, bei 50 Patienten im Korpus und bei 54 Patienten im Antrum lokalisiert. Nicht weiter spezifizierbar war die Lokalisation in 17 Fällen. Karzinome, die neben dem Magen zusätzlich den unteren Ösophagus involvierten, wurden von vornherein ausgeschlossen um die Verfälschung der Ergebnisse durch die Einbeziehung von Adenokarzinomen des Ösophagus in die Studie zu vermeiden.

Das Kollektiv für die Großflächenuntersuchungen entstand als Auswahl der acht aktuellsten Fälle aus der Gesamtzahl der *HER2*-positiven Fälle des TMA-Kollektivs.

3.3 TMA-Herstellung

Ein Tissue Micro Array (TMA) ist eine kompakte Anordnung von bis zu 1000 verschiedenen Gewebeproben in einem einzigen Paraffinblock. Schnitte eines solchen TMA-Blocks ermöglichen eine gleichzeitige und damit einheitlichere Bearbeitung, Färbung und Begutachtung sämtlicher zusammengefasster Gewebeproben (Kononen u. a. 1998).

Die für diese Arbeit ausgewählten Gewebeproben sind unmittelbar nach ihrer Gewinnung in 4%igem gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Zur TMA-Herstellung wurden zunächst HE-gefärbte Schnitte der Paraffinblöcke erstellt um mikroskopisch repräsentative Tumorregionen zu identifizieren. Die weitere Vorgehensweise wird mithilfe der Abbildung 3-2 erläutert.

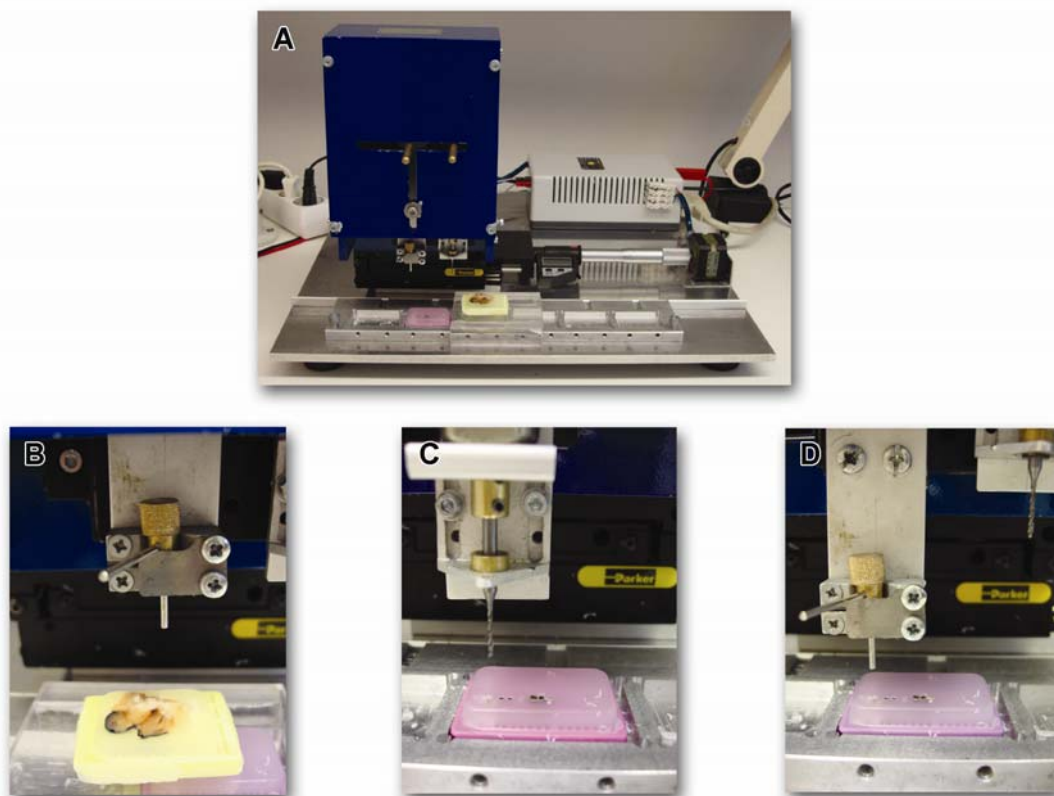


Abbildung 3-2 Herstellung eines *Tissue Micro Arrays*: Der halbbautomatische *Tissue Arrayer* aus Instituts-Eigenbau (A) ermöglicht die Anordnung von bis zu 1000 Gewebeszylindern auf einem TMA-Block. Anhand des korrespondierenden HE-Schnittes kann das auszustanzende Areal auf dem in diesem Beispiel gelben Gewebeblock identifiziert und anschließend mit einer Hohnadel (Innendurchmesser 0,6mm) aus dem Gewebeblock entnommen werden (B). Mit einem feinen Bohrkopf wird dann ein Loch mit einem Außendurchmesser von 0,6mm in den pinkfarbenen TMA-Block gebohrt (C). Dies erfolgt an einer zuvor für diesen Gewebeblock festgelegten Koordinate innerhalb eines X-Y-Koordinatensystems. Der entnommene Gewebezylinder wird dann an dieser Stelle in den TMA-Block eingesetzt (D).

Entsprechend den Erläuterungen zur Abbildung 3-2 wurden Gewebszylinder aller 166 Primärtumoren und aller 73 Metastasen in den TMA-Block eingebracht. Anschließend wurden von dem fertig gestellten TMA-Block 3µm dicke Schnitte mit Hilfe des *paraffin-sectioning-aid-system* (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ) angefertigt. Dieses unterstützt den Zusammenhalt der TMA-spots beim Schneiden und beim Aufbringen auf den Objektträger (Kononen u. a. 1998).

Um die technische Qualität des TMA-Blockes zu beurteilen wurde zunächst ein Schnitt in HE-Färbung erstellt (Abbildung 3-3).

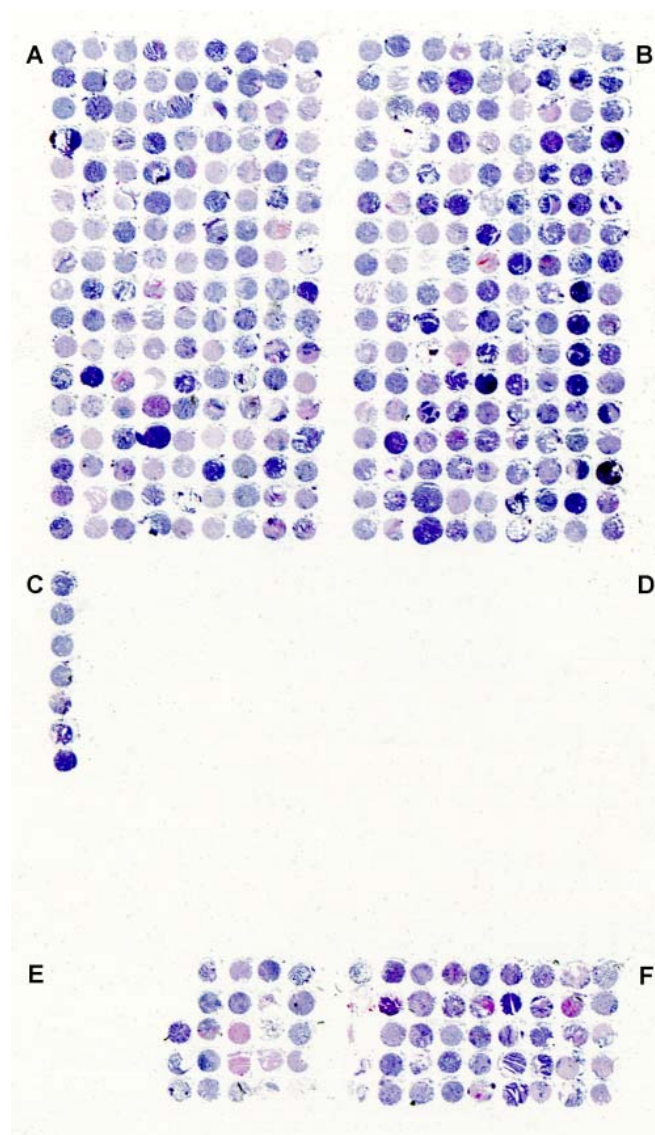


Abbildung 3-3 TMA-Schnitt (HE-Färbung): In den Sektoren A, B und C liegen die Anschnitte der ausgewählten Gewebszylinder (TMA-spots). In den Sektoren E und F liegt das Kontrollgewebe.

Die Differenz zwischen den 313 sichtbaren *spots* in den Sektoren A-C der Abbildung 3-3 und den 239 in dieser Arbeit ausgewerteten *spots* ergibt sich dadurch, dass 74 *spots* in der mikroskopischen Kontrolle nach der TMA-Herstellung als technisch unzureichend bewertet und damit bei den anschließenden Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt wurden. Grund für eine solche Bewertung war entweder eine Fehlstanzung, in der das gewünschte Gewebe nicht getroffen wurde oder auf den untersuchten TMA-Schnitten ganz fehlende *spots*.

Das Kontrollgewebe für diesen TMA-Block setzte sich gemäß Tabelle 3-1 zusammen. Anhand der Anfärbung dieser Kontroll*spots* konnte die Qualität der anschließend durchgeführten Spezialfärbungen überprüft werden.

Standard-Kontrollgewebe	Anzahl (<i>spots</i>)
Normale Magen-Mukosa (Antrum)	5
Normale Magen-Mukosa (Korpus)	5
Herz-Normalgewebe	2
Nieren-Normalgewebe	2
Lungen-Normalgewebe	2
Normale Kolon-Mukosa	2
Endometrium-Normalgewebe	2
Prostata-Normalgewebe	2
Lymphknoten-Normalgewebe	2
Normale Quergestreifte Muskulatur	2
Haut-Normalgewebe	2
Mamma-Karzinom-Gewebe	10
Lungen-Adenokarzinom-Gewebe	5
Lungen-Plattenepithelkarzinom-Gewebe	5
Kolon-Karzinom-Gewebe	10
Prostata-Karzinom-Gewebe	10

Tabelle 3-1 Standard-Kontrollgewebe

3.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der TMA-*spots* auf das Vorliegen einer HER2-Expression erfolgte mit Hilfe des HercepTest™ (DAKO, Glostrup, Denmark) gemäß Hersteller-Protokoll. Die Antigen-Demaskierung des paraffinierten 3µm dicken TMA-Schnittes wurde in einem 50-minütigen Wasserbad bei 95°-99°C vorgenommen. Nach der Peroxidasehemmung folgte die Inkubation des Schnittes mit dem vorverdünnten primären Antikörper.

Die Einteilung des Färbeverhaltens der Gewebes*spots* erfolgte anhand der Farbintensität entsprechend den für Magenkarzinome angepassten HER2-*scoring*-Empfehlungen in die Kategorien 0 (keine, bzw. Membranreaktivität in <10% der Zellen), 1+ (kaum erkennbare Membranreaktivität in >10% der Zellen), 2+ (schwache bis mäßige Reaktivität der basolateralen, bzw. der gesamten Membran in >10% der Zellen) und 3+ (starke Reaktivität der basolateralen, bzw. der gesamten Membran in >10% der Zellen) (Hofmann u. a. 2008).

Das Kontrollgewebe diente als Qualitätskontrolle der Färbung. Tumoren mit bekannter Positivität wurden als Positiv-Kontrollen verwendet. Als Negativ-Kontrollen dienten Präparate bei denen der primäre Antikörper nicht hinzugefügt worden war.

Die Abbildung 3-4 zeigt beispielhaft ein 3+ HER2-Färbeergebnis im Vergleich zu einer HE-Färbung desselben *spots*.

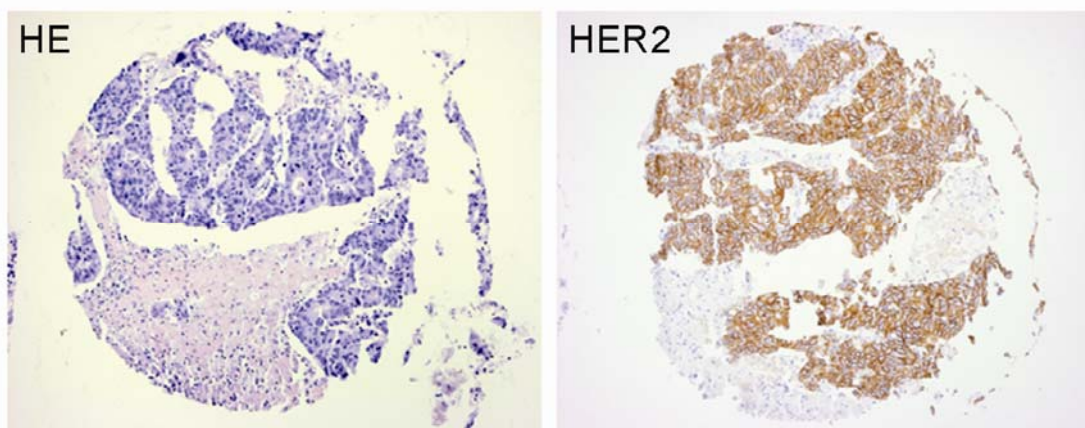


Abbildung 3-4 HE- und HER2-Färbung (3+) eines TMA-*spots*

3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zunächst wurden sämtliche TMA-spots mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf eine *HER2*-Amplifikation hin untersucht. Hierzu wurde der TMA-Schnitt zunächst mit dem *paraffin-pretreatment-reagent-kit* (Vysis, Downers Grove, IL, USA) vorbehandelt. Die Schnitte wurden deparaffiniert, luftgetrocknet, dehydriert und 5 Minuten lang bei 74°C in 70%iger Formamid-2× SSC-Lösung denaturiert. Dann erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer die Hybridisierung mit der FDA-zugelassenen Spectrum-Orange *HER2*-Sonde sowie einer Spectrum-Green Zentromer 17-Sonde (PathVysion™, Vysis-Abbott, Wiesbaden, Germany). Anschließend wurde der Schnitt gewaschen und mit 0,2µM 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in *anti-fade-Lösung* gegengefärbt.

Anhand der DAPI-Grundfärbung wurden morphologisch Tumorzellareale von auswertungsirrelevanten Gewebeanteilen unterschieden. Um Fehlinterpretationen aufgrund einer insuffizienten Hybridisierung zu vermeiden, wurden nur Zellen gezählt, die mindestens ein helles Zentromer-Signal aufwiesen. Abweichend von den Hersteller-Angaben wurde bei der Auswertung nicht die absolute Zahl der Signale in einer definierten Anzahl von Zellen pro Gewebeprobe festgestellt, sondern analog zu früheren Arbeiten die durchschnittliche Anzahl von *HER2*- und Zentromer 17-Signalen pro Gewebespot ermittelt (Bubendorf u. a. 1999; Tapia u. a. 2007; Schraml u. a. 1999).

Das Vorliegen einer *HER2*-Amplifikation wurde als eine *HER2*:Zentromer 17-Ratio von mindestens 2 (*low ratio*) bzw. größer als 3 (*high ratio*) definiert oder bei Vorhandensein verdichteter Gen-Cluster als Repräsentation intrachromosomaler Amplifikationen festgestellt.

Zur Untersuchung des *HER2*-Amplifikationsmusters der Großflächen wurden von ausgewählten Fällen 4µm dicke Schnitte aller zur Routinediagnostik hergestellten Gewebeblöcke angefertigt. Die *HER2*-FISH der Großflächen wurde entsprechend den Untersuchungen der TMA-spots durchgeführt und ausgewertet.

Die *HER2-Topoisomerase II α* -Koamplifikation wurde mit Hilfe eines dreifach-markierenden Sondencocktails evaluiert, der neben *HER2* und Zentromer 17 auch die *Topoisomerase II α* mit einschließt (LSI TOP2A/HER2/CEP17 Multi-color Probe, Vysis-Abbott, Des Plaines, IL, USA). Die Kriterien für eine *Topoisomerase II α* -Amplifikation waren analog zur *HER2*-Amplifikation eine *Topoisomerase II α* :Zentromer 17-Ratio größer als 2 bzw. das Vorhandensein verdichteter Gen-Cluster.

Beispiele einer hohen *HER2*-Amplifikation sowie einer *HER2-Topoisomerase II α* -Koamplifikation zeigt die Abbildung 3-5.

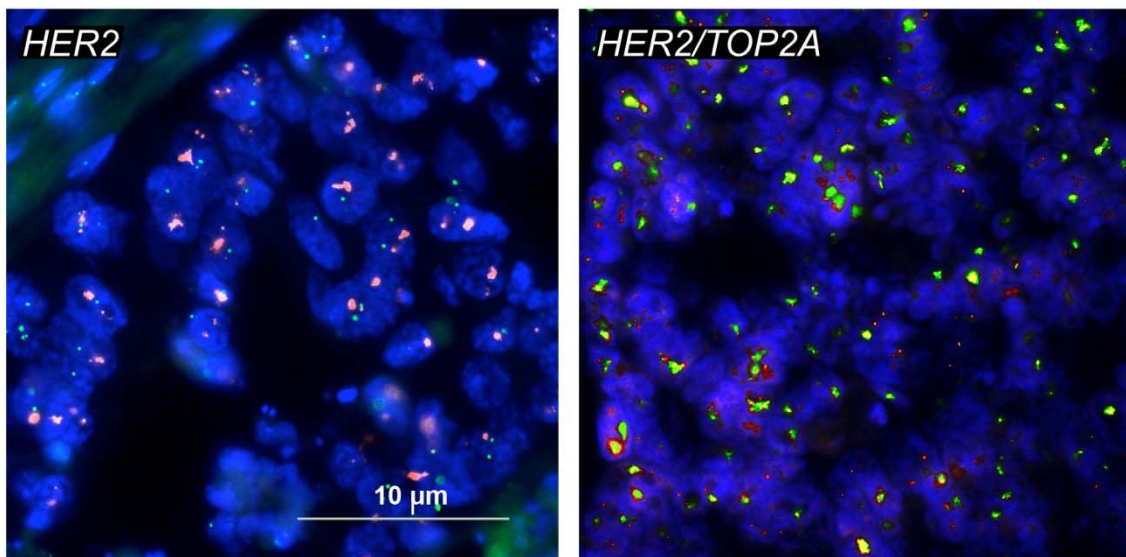


Abbildung 3-5 Hohe Amplifikationen von *HER2* und *Topoisomerasell α* (*TOP2A*) in Magenkarzinom-Arealen. Linkes Bild: Die orangefarbenen Signale repräsentieren multiple *HER2*-Genkopien. Das Vorliegen von orangefarbenen clustern gegenüber grünen Zentromer 17-Signalen zeigt eine *HER2*-Amplifikation an. Im rechten Bild ist als Korrelat einer Koamplifikation eine hohe Zahl verdichtet übereinander liegender grüner *HER2*- und roter *TOP2A*-Signale zu erkennen.

3.6 Statistik

Die Beziehungen zwischen *HER2*-Status und klinisch-pathologischen Parametern wurden mittels Kontingenztabellen-Analyse und Chi-Quadrat-Test analysiert. Alle Untersuchungen wurden unter Verwendung des Software-Paketes JMP (Version 5.0.1a; SAS Institute Inc., Cary, NC) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Technische Aspekte

Die Beurteilung der technischen Qualität des TMA-Blocks anhand eines HE-gefärbten Schnittes zeigte, dass 166 der ursprünglich 230 herausgesuchten Primärtumoren und 69 dazugehörige Lymphknoten als TMA-*spots* auswertbar waren. Alle 166 Primärtumoren waren auch auf sämtlichen nachfolgenden TMA-Schnitten zur HER2-Analyse auswertbar. 18 bzw. 20 der Lymphknotenproben waren in den immunhistochemischen bzw. FISH-Untersuchungen nicht analysierbar, da die *spots* nicht ausreichend Tumorgewebe enthielten.

4.2 HER2-Immunhistochemie

Eine HER2-Färbung (1+, 2+, 3+) war in 32 von 166 (19%) Magenkarzinomen feststellbar. Die membranöse Immunfärbung überwog in allen positiven Fällen. Eine schwache zytoplasmatische Immunreaktion war in wenigen Fällen vorhanden, wurde aber in der Analyse nicht berücksichtigt. Die Quantifizierung gemäß den magenkarzinomspezifischen HER2-scoring-Empfehlungen (Hofmann u. a. 2008) ergab 22 Fälle mit einer 3+ (13%), 6 Fälle mit einer 2+ (4%) und 4 Fälle mit einer 1+ (2%) –Färbung.

4.3 HER2-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Eine *HER2*-Amplifikation mit einer *HER2*:Zentromer 17-Ratio von mindestens 2 wurde in 27 von 166 (16%) Magenkarzinomen gefunden. Alle 27 Fälle zeigten eine eindeutige Amplifikation mit einer Ratio >2 und überwiegend dichtgepackten Gen-Clustern (Abbildung 3-5). Die Tabelle 4-1 zeigt die FISH-Ergebnisse im Detail und im Vergleich zu den immunhistochemischen Ergebnissen.

Fallnummer	Lokalisation	Lauren-Typ	FISH			IHC
			HER2-Signale	Zentromer 17-Signale	Ratio HER2/Zentromer 17	HER2
1 ^{G, T}	Kardia	intestinal	20	2	10	3+
2 ^G	Corpus	diffus	20	2	10	3+
3 ^G	Kardia	diffus	10	2	5	3+
4 ^{G, T}	Corpus	intestinal	20	2	10	3+
5 ^G	Kardia	intestinal	40	2	20	3+
6 ^{G, T}	Corpus	intestinal	30	2	15	3+
7 ^G	Antrum	intestinal	20	2	10	3+
8 ^G	Kardia	intestinal	10	2	5	3+
9	Antrum	intestinal	50	2	25	3+
10	Antrum	intestinal	50	2	25	3+
11	Corpus	intestinal	30	2	15	3+
12	Kardia	intestinal	30	2	15	3+
13	Kardia	intestinal	30	2	15	3+
14	Corpus	gemischt	20	2	10	3+
15	Antrum	intestinal	10	2	5	3+
16	Kardia	intestinal	30	2	15	3+
17	Kardia	intestinal	10	2	5	3+
18	Kardia	intestinal	10	2	5	3+
19	Corpus	gemischt	6	2	3	2+
20	Corpus	intestinal	6	2	3	3+
21	Corpus	gemischt	8	2	4	2+
22	Kardia	intestinal	6	2	3	2+
23	Kardia	intestinal	10	2	5	3+
24	Corpus	intestinal	10	2	5	2+
25	Antrum	intestinal	10	2	5	3+
26	Corpus	intestinal	20	2	10	3+
27	Kardia	intestinal	8	2	4	2+

^G In den Fällen 1-8 wurden zusätzlich Großflächenschnitte der Primärtumoren und Metastasen analysiert (siehe Tabelle 4-4)

^T Die Fälle 1,4,6 zeigten in der Großflächenuntersuchung zusätzlich eine hohe und homogene *Topoisomerasell α* -Amplifikation

Tabelle 4-1 FISH-Ergebnisse der *HER2*-amplifizierten TMA-spots und dazugehörige immunohistochemische Ergebnisse (IHC).

Ein Vergleich der FISH-Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern ergab eine signifikante Assoziation zwischen *HER2*-Amplifikation und histologischem Tumortyp nach Lauren. 22 von 106 Intestinal-Typ-Karzinomen (21%), aber nur 2 von 45 Karzinomen vom diffusen Typ (4%) waren *HER2*-amplifiziert ($p=0,042$; Tabelle 4-2).

	HER2 FISH				HER2 IHC					
	n	Ratio <2 (%)	Ratio >3 (%)	P	n	Neg. (%)	+1 (%)	+2 (%)	+3 (%)	P
<i>pT</i>										
1	21	86	14		21	86	0	5	9	
2	90	83	17		90	80	2	4	14	
3+4	55	84	16	0.9649	55	80	4	2	14	0.9228
<i>pN</i>										
0	45	87	13		45	82	5	2	11	
1	60	82	18		60	80	0	8	12	
2+3	61	84	16	0.7893	61	80	3	0	17	0.1577
<i>Grad</i>										
1	2	100	0		2	100	0	0	0	
2	56	71	29		56	70	2	5	23	
3	108	90	10	0.0085	108	86	3	3	8	0.1903
<i>pM</i>										
0	145	84	16		145	81	3	4	12	
1	21	81	19	0.7116	21	76	0	5	19	0.7203
<i>UICC-Stadium</i>										
la	15	87	13		15	86	0	7	7	
lb	26	92	8		26	88	4	0	8	
II	35	83	17		35	79	3	9	9	
IIIa	30	80	20		30	80	0	3	17	
IIIb	13	85	15		13	85	0	0	15	
IV	47	81	19	0.8324	47	74	4	2	20	0.781
<i>Lauren-Typ</i>										
intestinal	106	79	21		106	77	1	5	17	
diffus	45	96	4		45	89	7	2	2	
gemischt	15	80	20	0.042	15	80	0	0	20	0.0595
<i>Lokalisation</i>										
Kardia	45	27	30		45	27	0	33	32	
Corpus	50	27	44		50	27	50	33	45	
Antrum	54	34	26		54	34	50	33	23	
nicht spezifiziert	17	12	0	0.1113	17	13	0	0	0	0.4173
<i>Geschlecht</i>										
Male	117	85	15		117	82	2	2	14	
Female	49	82	18	0.6348	49	78	4	6	12	0.5406
<i>Alter</i>										
<40	4	100	0		4	100	0	0	0	
40-50	11	82	18		11	73	9	0	18	
51-60	30	97	3		27	87	7	3	3	
61-70	59	81	19		57	82	0	3	15	
>70	62	79	21	0.2192	55	77	2	5	16	0.5459

Tabelle 4-2 Klinische Parameter und HER2-Status

Ein Vergleich der *HER2*-Amplifikation mit dem pT-, pN-, pM- und UICC-Stadium sowie Tumor-Phänotyp ergab keine statistischen Assoziationen, mit Ausnahme eines signifikant höheren Auftretens einer *HER2*-Amplifikation in Grad 2-Tumoren verglichen mit Grad 3-Tumoren ($p=0,0085$). Dies ist mit der hohen Anzahl diffuser Tumoren in der Grad 3-Gruppe erklärbar.

4.4 Vergleich der HER2-Positivitätsdiagnostik mittels FISH und Immunhistochemie

Die HER2-Expression war eng mit der *HER2*-Amplifikation verknüpft ($p < 0,0001$; Abbildung 4-1). Alle amplifizierten Fälle zeigten entweder eine 2+ oder eine 3+ immunhistochemische Färbung. Lediglich ein Fall mit einer deutlich HER2-positiven Färbung zeigte in der FISH keine Amplifikation.

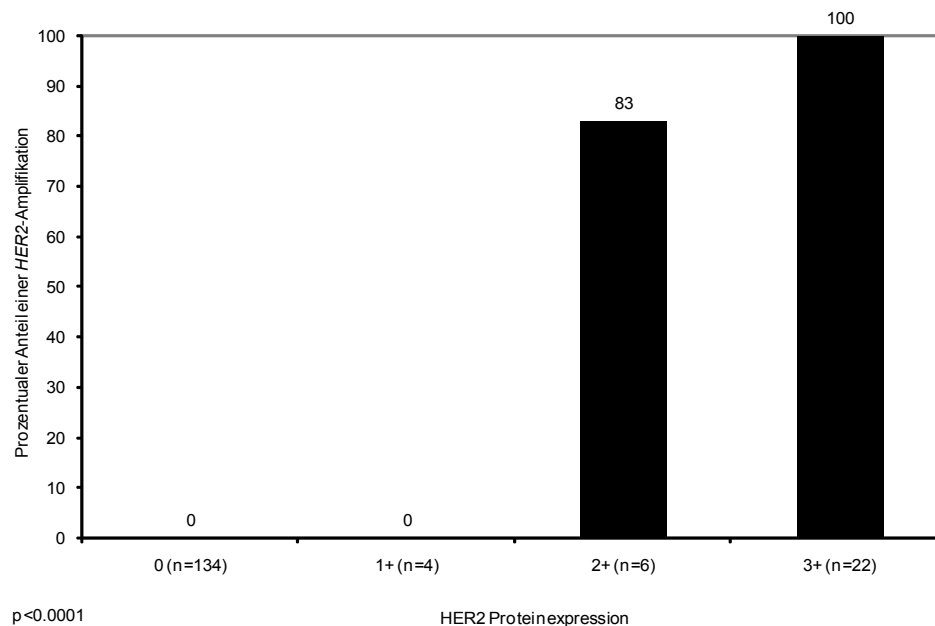


Abbildung 4-1 Vergleich der HER2-Expression mit der *HER2*-Amplifikation

4.5 HER2-Homogenitätsanalyse an TMA-spots

Sowohl an immunhistochemisch gefärbten als auch an FISH-TMA-spots wurde die HER2-Positivität zwischen spots mit Primärtumor- und korrespondierendem metastatischen Gewebe verglichen. Dies war auf dem immunhistochemisch gefärbten TMA-Schnitt bei 51 Paarungen und auf dem FISH-TMA-Schnitt bei 49 Paarungen möglich. Auf dem FISH-TMA-Schnitt konnten keine Abweichungen des HER2-Status zwischen Primarius und Lymphknoten festgestellt werden. Auch der immunhistochemisch ermittelte HER2-Status war bis auf einen Fall konkordant (Tabelle 4-3).

	HER2-Immunhistochemie			HER2-FISH		
	T	N	Konkordanz	T	N	Konkordanz
HER2-positiv	8	7	7/8 (87,5 %)	7	7	7/7 (100 %)
HER2-negativ	43	44	43/44 (97,7 %)	42	42	42/42 (100 %)

Tabelle 4-3 Vergleich des HER2-Status zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. *Abkürzungen:* T (Anzahl der Primärtumorspots); N (Anzahl der Lymphknotenmetastasespots).

4.6 Großflächenuntersuchung

Die Untersuchung des *HER2*-Amplifikationsmusters an Großflächen der 8 aktuellsten HER2-positiven Fälle ergab eine durchgehend homogene HER2-Amplifikation in allen 62 untersuchten Schnitten (Tabelle 4-4). Die Amplifikation bestand üblicherweise in 10-50 Genkopien, die überwiegend in Gen-Clustern angeordnet waren.

Fallnummer	Primärtumoren (Anzahl untersuchter Großflächenschnitte)	Lymphknoten- Metastasen (Anzahl untersuchter Großflächenschnitte)	<i>HER2</i> - Amplifikationsmuster
1	1	8	homogen
2	1	5	homogen
3	3	7	homogen
4	4	6	homogen
5	2	1	homogen
6	4	12	homogen
7	2	3	homogen
8	1	2	homogen

Tabelle 4-4 Großflächenuntersuchung in 8 HER2-positiven Fällen.

4.7 *Topoisomerase II α* -FISH

Alle Großflächenschnitte wurden auf eine *HER2-Topoisomerase II α* -Koamplifikation hin untersucht. Die *Topoisomerase II α* war in 3 der 8 Fälle mit hoher *HER2*-Amplifikation koamplifiziert (38%; Tabelle 4-1). Das *Topoisomerase II α* -Amplifikationsmuster war ebenfalls homogen; Amplifikationen waren entweder in jedem oder in keinem untersuchten Großflächenschnitt eines Falles zu sehen.

5 Diskussion

Eine immunhistochemische HER2-Positivität (3+) wurde in 22 von 166 (13%) interpretierbaren Magenkarzinomfällen festgestellt. Andere Untersucher die dieselben FDA-zugelassenen Reagenzien verwendeten, beschreiben ähnliche Häufigkeiten einer HER2-Überexpression. Eine Literaturrecherche zum HER2-Status ergab einen durchschnittlichen HER2-Positivitätswert von 17,4% in Magenkarzinomen (Tabelle 1-1, Seite 6).

Die HER2-Überexpression war überwiegend auf den Intestinal-Typ der Magenkarzinome nach Lauren beschränkt, wohingegen Karzinome vom diffusen Typ in dieser wie auch in früheren Untersuchungen (Tanner u. a. 2005) eher HER2-negativ waren (21% vs. 4%). Dieses Ergebnis stützt die Vorstellung, dass auch auf molekularer Ebene wesentliche Unterschiede zwischen diesen beiden histologischen Tumortypen bestehen, die ihre Ursache in unterschiedlichen Genveränderungen während der Karzinogenese haben könnten. So ist zum Beispiel eine verminderte oder abnorme E-Cadherin-Expression ein typisches molekulares Merkmal eines diffus wachsenden Magenkarzinoms (Mayer u. a. 1993; Machado u. a. 2000). Eine weitere Studie fand, dass die E-Cadherin-Mutation in Magenkarzinomen invers mit der HER2-Expression assoziiert ist (Berx u. a. 1998).

Eine oft hochgradige und häufig homogene *HER2*-Amplifikation ist bereits für Adenokarzinome des distalen Ösophagus (Barrett-Karzinome) beschrieben worden (Reichert u. a. 2007). Da Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs von denen der Kardia histologisch nicht zu unterscheiden sind, wurden im Rahmen der Kollektivauswahl Karzinome die einen Befall des distalen Ösophagus zeigten ausgeschlossen, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden. Der Einschluss von Barrett-Karzinomen könnte die in einer anderen Studie gefundene erhöhte HER2-Expression in Kardiakarzinomen erklären (Tanner u. a. 2005). In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der *HER2*-Amplifikation bzw. HER2-Überexpression und der Tumor-Lokalisation festgestellt werden (Tabelle 4-2).

Bemerkenswerterweise zeigten 27 der 28 (96%) immunhistochemisch HER2-positiven Magenkarzinome auch eine *HER2*-Amplifikation. Die *HER2*-FISH-Negativität dieses einen 2+ immunhistochemisch positiven Karzinoms könnte durch ein falsch-positives Ergebnis der Immunhistochemie erklärt sein (Sauter u. a. 2009). Es ist bekannt, dass eine ungenügende Formalin-Fixierung mit nachfolgender Ethanol-Exposition des Gewebes zu falsch-positiven HER2-Ergebnissen in der Immunhistochemie führen kann (Roche u. a. 2002; Tapia u. a. 2004).

Die praktisch vollständige Übereinstimmung von *HER2*-Amplifikation und HER2-Überexpression deutet darauf hin, dass beim Magenkarzinom, wie beim Mammakarzinom auch, die Gen-Amplifikation vermutlich der einzige Mechanismus ist, der zu einer HER2-Überexpression führt. Andere Untersuchungen stützen diese Vermutung auch für weitere epitheliale Tumoren. So wurde in einer Studie an 255 Ösophagus-Karzinomen und in einer großangelegten TMA-Studie mit über 4000 Tumorproben von 120 verschiedenen Entitäten kein relevantes Auftreten einer HER2-Überexpression bei fehlender Gen-Amplifikation beobachtet (Tapia u. a. 2007; Reichelt u. a. 2007).

Das Vorhandensein einer *HER2*-Amplifikation ist ein prädiktiv entscheidender Parameter für das Ansprechen einer Trastuzumab-Therapie bei Mammakarzinomen (Gullo u. a. 2009). Eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß einer *HER2*-Amplifikation und der Rate eines vollständigen Therapieansprechens im Rahmen einer neoadjuvanten Behandlung ist beschrieben (Arnould u. a. 2007). Allerdings liegen die Ansprechraten auf eine Trastuzumab-Therapie bei HER2-positiven Mammakarzinomen insgesamt nur zwischen 35 und 70% (Dawood u. a. 2007; Adamo u. a. 2007; Vogel u. a. 2002). Die Heterogenität der *HER2*-Amplifikation bzw. HER2-Überexpression innerhalb eines Tumors sowie zwischen Primärtumor und Metastasen ist eine mögliche Ursache für ein Therapieversagen, insbesondere da in der Regel lediglich der entnommene Primärtumor molekular analysiert wird und nicht die zu behandelnde im Patienten verbliebene Metastase.

Da die *HER2*-Amplifikation in allen 62 analysierten Großflächenschnitten von 8 untersuchten Magenkarzinomen durchgehend homogen war, lässt sich die Vermutung anstellen, dass in der Mehrzahl der *HER2*-positiven Magenkarzinome die Ursache für ein Nichtansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie nicht im Vorliegen eines heterogenen Amplifikationsmuster zu finden sein dürfte. Obwohl die Zahl der untersuchten Fälle nicht groß ist, deutet dieses Ergebnis doch an, dass die *HER2*-Amplifikation in Magenkarzinomen generell homogen sein könnte.

Die Vermutung einer grundlegenden Homogenität der *HER2*-Amplifikation in Magenkarzinomen lässt sich zusätzlich mit der Konkordanz des *HER2*-Status zwischen 51 Primärtumorspots und den korrespondierenden Metastasenspots auf dem TMA stützen. Dies wäre vergleichbar mit dem Amplifikationsmuster in Mammakarzinomen, in denen eine Heterogenität innerhalb der Primärtumoren sowie zwischen Primärtumor und Metastasen äußerst selten ist (Simon u. a. 2001).

Das Vorhandensein einer Amplifikation in praktisch jeder Tumorzelle eines *HER2*-positiven Magenkarzinoms, unabhängig vom Tumorstadium, spricht für eine frühes Auftreten dieser Gen-Veränderung in der Karzinogenese des Magenkrebses. Auch dies weist Parallelen zum Mammakarzinom auf, in welchem ebenfalls in unterschiedlichen Tumorstadien, einschließlich dem duktalem Carcinoma-in-situ, *HER2*-Veränderungen stets in gleichbleibender Häufigkeit zu finden sind (Park u. a. 2006).

Diese homogene und hochgradige *HER2*-Amplifikation in *HER2*-positiven Magenkarzinomen spricht für eine therapeutische Anwendbarkeit von Trastuzumab auch beim Magenkarzinom. Diese Hypothese wurde durch eine kürzlich auf dem ASCO (American Society of Clinical Oncology)-Kongress 2009 vorgestellte Phase III-Studie an 3807 Patienten bestätigt. Diese Studie fand einen mit 13,5 Monaten signifikant verlängerten medianen Überlebenszeitraum bei Patienten die mit einer Trastuzumab-Chemotherapie-Kombination behandelt wurden, gegenüber 11,1 Monaten medianem Überleben bei Patienten unter einer alleinigen Chemotherapie ($p=0.0048$) (Van Cutsem u. a. 2009).

Die *Topoisomerase II α* (*TOP2A*) wurde lediglich bei den acht Patienten des Großflächen-Kollektivs untersucht. Dennoch stimmt das Ergebnis einer homogenen Koamplifikation von *TOP2A* in drei von acht (37,5%) HER2-positiven Magenkarzinomen (Tabelle 4-1) mit einer größer angelegten Untersuchung überein, in der eine *TOP2A-HER2*-Koamplifikation in 13 von 38 (34%) Magenkarzinomen beobachtet wurde (Kanta u. a. 2006). Die unmittelbare Nachbarschaft dieser beiden Gene auf dem Genlokus 17q21 ermöglicht, dass in koamplifizierten Fällen beide Gene in demselben Amplikon enthalten sind (Keith u. a. 1993). Dieser Zusammenhang erklärt, dass in dieser Untersuchung, wie bei der *HER2*-Amplifikation, keine *TOP2A*-Heterogenität gefunden wurde.

Die *TOP2A*-Amplifikation besitzt klinische Relevanz in Mammakarzinomen, da sie das Ansprechen auf eine Anthrazyklin-Therapie prognostiziert (Arriola u. a. 2007; Tanner u. a. 2006). Eine Homogenität der *TOP2A*-Amplifikation in Magenkarzinomen würde somit für einen hohen therapeutischen Wert dieser molekularen Veränderung als medikamentösen Angriffspunkt sprechen. Klinische Studien die den Zusammenhang zwischen *TOP2A*-Amplifikation und den Therapieerfolg einer Anthrazyklin-Therapie sowie einer Anthrazyklin-Trastuzumab-Kombinationstherapie in Magenkarzinomen untersuchen wären daher interessant.

6 Zusammenfassung

In der Therapie des Mammakarzinoms wird mit Trastuzumab bereits erfolgreich ein monoklonaler Antikörper gegen das HER2-Protein eingesetzt. In Adenokarzinomen des Magens liegt eine dem Mammakarzinom vergleichbare Häufigkeit eines positiven HER2-Status vor.

Eine Heterogenität des HER2-Status zwischen Primärtumor und Metastasen könnte Ursache eines Misserfolges einer Anti-HER2-Therapie sein.

Um die Voraussetzungen für die Wirksamkeit einer Trastuzumab-Therapie bei Magenkarzinom-Patienten beurteilen zu können wurde die *HER2*-Amplifikation und HER2-Überexpression in 166 Magenprimärtumoren und 69 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen untersucht, um anschließend die HER2-positiven Fälle anhand von sämtlich verfügbaren Großflächenschnitten in Hinblick auf eine mögliche Heterogenität der *HER2*-Amplifikation zu beurteilen.

Die Analyse der 166 Magenkarzinomproben auf einem eigens erstellten *Tissue Micro Array* (TMA) ergab unter Verwendung FDA-zugelassener Reagenzien eine HER2-Überexpression (2+, 3+) in 28 (17%) und eine *HER2*-Amplifikation in 27 (16%) der Karzinome bei statistisch signifikantem Überwiegen im intestinalen Typ nach Lauren. Eine Assoziation der HER2-Positivität mit Tumorstadium (pT, pN, pM, UICC), bzw. Tumordifferenzierungsgrad wurde nicht festgestellt.

Die *HER2*- und *Topoisomerase II α* -Amplifikation zeigte keinerlei Heterogenität in der Analyse von 62 Großflächenschnitten von 8 Adenokarzinomen des Magens. Auch zwischen Primärtumor- und Metastasenspots auf dem TMA war der HER2-Status bis auf einen von 51 Fällen konkordant.

Die Kombination eines überwiegend hochgradig positiven HER2-Status mit dem homogenen Amplifikationsmuster innerhalb der Primärtumoren sowie zwischen Primärtumor und Metastasen ist ein deutlicher Hinweis auf eine potenzielle Wirksamkeit einer Trastuzumab-Therapie in HER2-positiven Magenkarzinomen..

Literaturverzeichnis

Adamo u. a., 2007. Safety and activity of trastuzumab-containing therapies for the treatment of metastatic breast cancer: our long-term clinical experience (GOIM study). *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18 Suppl 6, vi11-5.

Akiyama u. a., 1986. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4758), 1644-6.

al-Kasspooles u. a., 1993. Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 54(2), 213-219.

Allgayer u. a., 2000. c-erbB-2 Is of Independent Prognostic Relevance in Gastric Cancer and Is Associated With the Expression of Tumor-Associated Protease Systems. *J Clin Oncol*, 18(11), 2201-2209.

Aoyagi u. a., 2001. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 in superspreading-type and penetrating-type gastric carcinoma. *The Kurume Medical Journal*, 48(3), 197-200.

Arnould u. a., 2007. Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(21), 6404-9.

Arriola u. a., 2007. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 106(2), 181-9.

Baselga u. a., 1999. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Seminars in Oncology*, 26(4 Suppl 12), 78-83.

- Berns u. a., 1992. Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 28(2-3), 697-700.
- Berx u. a., 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Human Mutation*, 12(4), 226-37.
- Brenner, Rothenbacher & Arndt, 2009. Epidemiology of stomach cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 472, 467-77.
- Brown, 2000. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283-297.
- Bubendorf u. a., 1999. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Research*, 59(4), 803-6.
- Carter u. a., 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4285-9.
- Coggon u. a., 1989. Stomach cancer and food storage. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(15), 1178-82.
- Cooley u. a., 1999. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology*, 27(10), 1533-1541.
- Cortes-Funes u. a., 2007. Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC) with HER2/neu overexpression/amplification. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 25(18_suppl), 4613.

- Cristallini, Ascani & Bolis, 1992. Association between histologic type of polyp and carcinoma in the stomach. *Gastrointestinal Endoscopy*, 38(4), 481-484.
- Dall'Acqua u. a., 1974. [Research on the interactions between DNA and anthracycline antibiotics]. *Il Farmaco; Edizione Scientifica*, 29(9), 682-696.
- Dawood u. a., 2007. Efficacy and safety of neoadjuvant trastuzumab combined with paclitaxel and epirubicin: a retrospective review of the M. D. Anderson experience. *Cancer*, 110(6), 1195-200.
- Delord u. a., 2005. Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(12), 1889-1897.
- D'Emilia u. a., 1989. Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene*, 4(10), 1233-1239.
- Dursun u. a., 1999. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: correlation with histopathologic characteristics and analysis of Ki-67. *Pathology Oncology Research: POR*, 5(2), 104-6.
- El-Zimaity, Genta & Graham, 1996. Histological features do not define NSAID-induced gastritis. *Human Pathology*, 27(12), 1348-1354.
- Esaki, Hirayama & Hirokawa, 1990. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histologic type and age. *Cancer*, 65(9), 2086-2090.
- Ferlay u. a., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(3), 581-92.
- Fuchs & Mayer, 1995. Gastric carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 333(1), 32-41.

GLOBOCAN, 2002. CANCERmondial. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/>
[Zugegriffen März 8, 2009].

Gullo u. a., 2009. Level of HER2/neu gene amplification as a predictive factor of response to trastuzumab-based therapy in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Investigational New Drugs*, 27(2), 179-83.

Gürel u. a., 1999. The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological factors in gastric cancer. *The Journal of International Medical Research*, 27(2), 74-8.

Henson u. a., 2004. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 128(7), 765-770.

Hetzel u. a., 1992. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 47(2), 179-85.

Hicks u. a., 2005. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Human Pathology*, 36(4), 348-356.

Hirashima u. a., 2001. Protein overexpression and gene amplification of c-erb B-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 14(6), 556-62.

Hofmann u. a., 2008. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*, 52(7), 797-805.

Hsu u. a., 1991. Early gastric cancer arising from localized Ménétrier's disease. *Gastroenterologia Japonica*, 26(2), 213-217.

- Hudziak, Schlessinger & Ullrich, 1987. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), 7159-63.
- Hynes & Lane, 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, 5(5), 341-54.
- Inui u. a., 2006. HER-2 overexpression and targeted treatment by trastuzumab in a very old patient with gastric cancer. *Journal of Internal Medicine*, 260(5), 484-7.
- Kanta u. a., 2006. Topoisomerase IIalpha gene amplification in gastric carcinomas: correlation with the HER2 gene. An immunohistochemical, immunoblotting, and multicolor fluorescence in situ hybridization study. *Human Pathology*, 37(10), 1333-43.
- Kaptain, Tan & Chen, 2001. Her-2/neu and breast cancer. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 10(3), 139-52.
- Keith u. a., 1993. Co-amplification of erbB2, topoisomerase II alpha and retinoic acid receptor alpha genes in breast cancer and allelic loss at topoisomerase I on chromosome 20. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 29A(10), 1469-75.
- Koeppen u. a., 2001. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology*, 38(2), 96-104.
- Kononen u. a., 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, 4(7), 844-7.
- Lauren, 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31-49.

- Lee u. a., 1989. HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *The EMBO Journal*, 8(1), 167-73.
- Lee u. a., 2003. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 33(4), 173-9.
- Machado, Carneiro & Sobrinho-Simões, 2000. E-cadherin mutations in gastric carcinoma. *The Journal of Pathology*, 191(4), 466-8.
- Mano u. a., 2007. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 64-77.
- Mass u. a., 2005. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clinical Breast Cancer*, 6(3), 240-6.
- Matsuzaka u. a., 2007. The decreasing burden of gastric cancer in Japan. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 212(3), 207-19.
- Mayer u. a., 1993. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Research*, 53(7), 1690-5.
- McKenzie u. a., 1993. Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer. *Cancer*, 71(12), 3942-6.
- Mitra u. a., 1994. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Research*, 54(3), 637-9.
- Neugut, Hayek & Howe, 1996. Epidemiology of gastric cancer. *Seminars in Oncology*, 23(3), 281-291.

- Nicholas, Cripps & Au, 2006. Early results of a trial of trastuzumab, cisplatin and docetaxel for the treatment of metastatic gastric cancer overexpressing HER-2. *ESMO (2006)*, 17(Suppl 9), 316 (Abstr 1105).
- Normanno u. a., 2005. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current Drug Targets*, 6(3), 243-57.
- Nunobe u. a., 2008. Incidence of gastric cancer in the remnant stomach after proximal gastrectomy. *Hepato-Gastroenterology*, 55(86-87), 1855-1858.
- Ooi u. a., 1998. Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 78(3), 345-51.
- Ougolkov u. a., 2000. Altered expression of beta-catenin and c-erbB-2 in early gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 19(3), 349-55.
- Ougolkov u. a., 2003. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. *International Journal of Colorectal Disease*, 18(2), 160-6.
- Park u. a., 2006. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*, 48(6), 702-7.
- Parl u. a., 1979. Histologic and morphometric study of chronic gastritis in alcoholic patients. *Human Pathology*, 10(1), 45-56.
- Petit u. a., 1997. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *The American Journal of Pathology*, 151(6), 1523-1530.

- Pinto-de-Sousa u. a., 2002. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *International Journal of Surgical Pathology*, 10(4), 247-56.
- Rayson u. a., 2008. Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(9), 1530-1539.
- Rebischung u. a., 2005. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 8(4), 249-52.
- Reichelt u. a., 2007. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(1), 120-9.
- Risio u. a., 2003. HER2 testing in gastric cancer: molecular morphology and storage time-related changes in archival samples. *International Journal of Oncology*, 23(5), 1381-7.
- RKI, 2008. KID2008.pdf (application/pdf-Objekt). Available at: http://www.rki.de/cln_091/nn_205760/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2008,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2008.pdf [Zugegriffen März 8, 2009].
- Roche u. a., 2002. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(11), 855-7.
- Rubin & Williams, 2000. *Clinical Oncology: A Multidisciplinary Approach for Physicians and Students*. Saunders, 701/702.

- Sanz-Ortega u. a., 2000. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histology and Histopathology*, 15(2), 455-62.
- Sastre, Garcia-Saenz & Diaz-Rubio, 2006. Chemotherapy for gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 12(2), 204-13.
- Sauter u. a., 2009. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1323-1333.
- Sauter u. a., 1993. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Research*, 53(10 Suppl), 2199-203.
- Schraml u. a., 1999. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(8), 1966-75.
- Simon u. a., 2001. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(15), 1141-6.
- Slamon u. a., 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785), 177-82.
- Slamon u. a., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4905), 707-12.
- Slamon u. a., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, 344(11), 783-92.
- Smith u. a., 2007. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, 369(9555), 29-36.

Sobala u. a., 1993. Bile reflux and intestinal metaplasia in gastric mucosa. *Journal of Clinical Pathology*, 46(3), 235-240.

Solcia u. a., 1996. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *The American Journal of Surgical Pathology*, 20 Suppl 1, S8-22.

Takehana u. a., 2002. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 98(6), 833-7.

Tanner u. a., 2005. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(2), 273-8.

Tanner u. a., 2006. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(16), 2428-36.

Tapia u. a., 2007. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(2), 192-8.

Tapia u. a., 2004. HER2 analysis in breast cancer: reduced immunoreactivity in FISH non-informative cancer biopsies. *International Journal of Oncology*, 25(6), 1551-7.

Terry, Gaudet & Gammon, 2002. The epidemiology of gastric cancer. *Seminars in Radiation Oncology*, 12(2), 111-27.

- Toh, van Driel & Gleeson, 1992. Autoimmune gastritis: tolerance and autoimmunity to the gastric H⁺/K⁺ ATPase (proton pump). *Autoimmunity*, 13(2), 165-172.
- Tripathy u. a., 2004. Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(6), 1063-70.
- Tuma, 2005. Trastuzumab trials steal show at ASCO meeting. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 870-1.
- Valabrega, Montemurro & Aglietta, 2007. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(6), 977-984.
- Van Cutsem u. a., 2009. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). , 2009 ASCO Annual Meeting , J Clin Oncol 27:18s, 2009 (suppl; abstr LBA4509) .
- Vogel u. a., 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(3), 719-26.
- Wagner u. a., 2006. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(18), 2903-2909.
- Yamaoka, Kato & Asaka, 2008. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 47(12), 1077-83.

Yano u. a., 2006. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncology Reports*, 15(1), 65-71.

Zhang, 2007. The risk of gastric cancer in patients with duodenal and gastric ulcer: research progresses and clinical implications. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 38(1), 38-45.

Danksagung

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter, dessen kontinuierliche Unterstützung diese Arbeit maßgeblich trug und gestaltete sowie meinem Betreuer Dr. med. Andreas Marx, der mich über die gemeinsame Arbeit an diesem Projekt, über die Teilhabe an weiteren Projekten und an seiner diagnostischen Tätigkeit sowie über die Vermittlung meines Australien-Aufenthaltes für die Pathologie begeisterte.

Vielen Dank auch für das enorme Engagement des Laborteams, allen voran Silvia Schnöger und Martina Mirlacher.

Desweiteren danke ich meinem Lieblingskommilitonen Pawel Bralla für die gemeinsam durchlebten sechs Studienjahre, meiner Freundin Kerstin Möbius für ihre Unterstützung zu jedem Zeitpunkt während dieser Arbeit sowie Dr. med. Tanja Bertram für ihre konstruktive Finisierung.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Lars Tharun

Lars Tharun
Hamburg, September
2009