

Institut für Pathologie

(Universität Hamburg)

Prof. Dr. med. G. Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. A. Quaas, Dr. med. W. Wilczak
und Prof. Dr. med. G. Sauter

Veränderung des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) bei Sarkomen

Dissertation

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

vorgelegt von

Marcel Hochreiter
geb. in Pinneberg

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 29.05.2009
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. T. Brümmendorf
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Meinen Eltern !

1	Einleitung	2
1.1	Histologische Entitäten	3
1.2	Tyrosinkinase-Rezeptoren	5
1.3	EGFR (HER1)	6
1.4	Tissue Microarray (TMA)	9
1.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	10
1.6	Polymerase-chain-reaktion (PCR)	10
2	Ziel- und Fragestellung	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Patientengut	12
3.2	Pathologie und Befunde	12
3.3	Herstellung des Tissue Microarray	13
3.4	Immunhistochemie (IHC)	16
3.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	17
3.6	Exon-Mutations Analyse mittels Polymerase-chain-reaktion (PCR)	21
4	Ergebnisse	23
4.1	FISH	23
4.2	EGFR-Expression	24
4.3	EGFR-Expression bei den amplifizierten und polyploiden Weichteilsarkomen	25
4.4	EGFR-Mutation	26
5	Diskussion	28
6	Zusammenfassung	32
7	Abkürzungsverzeichnis	34
8	Literaturverzeichnis	35
9	Lebenslauf	45
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:	46
11	Danksagung	47

1 Einleitung

Sarkome sind eine seltene heterogene Gruppe von über 100 unterschiedlichen malignen Tumorarten die nach ihrem primären Entstehungsort in Knochen- und Weichgewebssarkome unterteilt werden können.

Zu den Knochensarkomen zählen das Osteosarkom, das Ewing Sarkom, das Chondrosarkom, der maligne Riesenzelltumor und das maligne Adamantinom.

Die Weichteilsarkome sind eine inhomogene Gruppe maligner Tumore neuroektodermalen und mesenchymalen Ursprungs. Die histologische Typisierung der Weichgewebstumore erfolgt gemäß phänotypischer Differenzierungsmerkmale des jeweils vorherrschenden Zelltyps nach der WHO-Klassifikation [66].

Die Inzidenz beträgt 2-3 Neuerkrankungen je 10000 Einwohner, das heißt, dass in der Bundesrepublik Deutschland jährlich circa 2000–3000 Weichgewebssarkome neu diagnostiziert werden, mit zunehmender Tendenz [72]. Damit machen sie nahezu 1% aller Malignome im Erwachsenenalter aus, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind (bevorzugt vom 45. bis 55. Lebensjahr) [15].

Der Sarkomanteil an den kindlichen (<15 Jahren) Malignomen liegt bei circa 7% [1].

Häufigsten Primärlokalisationen sind neben der unteren Extremität mit circa 40%, der Körperstamm einschließlich Retroperitoneum mit circa 30%. Auf die obere Extremität entfallen 20% und mit etwa 10% ist die Hals- und Kopfregion am seltensten betroffen [1].

Das häufigste Symptom ist eine über lange Zeit bestehende schmerzlose Raumforderung [54]. Die oligosymptomatische Präsentation sowie die Entstehung der Tumore in Körperregion, an denen eine Raumforderung erst spät bemerkt wird, führt dazu, dass sich die Patienten häufig erst mit lokal fortgeschrittenen Tumorstadien vorstellen. Entsprechend muss auch mit einer Metastasierungsrate von rund 25% bei Erstdiagnosestellung gerechnet werden. Die hämatogene Metastasierung steht dabei im Vordergrund. Vornehmlich befallen ist die Lunge, die bei über 70% der Patienten betroffen ist. Weitere Zielorgane sind die Leber und seltener das Skelettsystem. Lymphknotenmetastasen werden nur selten beobachtet [67].

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt insgesamt zwischen 50% und 60% [72], die schlechteste Prognose haben die malignen Sarkome mit myogener Differenzierung. Die häufigste Todesursache ist hierbei die Ausbildung von Metastasen und deren Folgen. In seltenen Fällen ist ein unkontrolliertes lokales Wachstum im Sinne von immer wiederkehrenden Lokalrezidiven für den Tod verantwortlich. Dies gilt insbesondere für Weichteilsarkome am Hals und Kopf, sowie im Retroperitoneum und viszeralem Raum [54].

1.1 Histologische Entitäten

Nachfolgend sind die wichtigsten Weichteilsarkome aufgeführt:

Maligne Tumore lipoiden Ursprungs

- hochdifferenziertes / atypisches Liposarkom
- rundzelliges / myxoides Liposarkom
- pleomorphes Liposarkom
- gemischtes Liposarkom

Fibroblastische Tumore

- erwachsenen Fibrosarkom
- myxoides Fibrosarkom
- low grade Fibrosarkom
- sklerosierendes epitheloides Fibrosarkom

Fibrohistiocytäre Tumore

- pleomorphes Sarkom (NOS = not otherwise specified) - früher bezeichnet als malignes fibröses Histiozytom (MFH)

Tumor myogenen Ursprungs

- Leiomyosarkom

Tumore der Skelettmuskulatur

- embryonales/fetales Rhabdomyosarkom
- alveoläres Rhabdomyosarkom
- pleomorphes Rhabdomyosarkom

Vasculäre Tumore

- epitheloidzelliges Haemangioendotheliom
- Angiosarkom (inklusive Kaposi-Sarkom)

Synoviale Tumore

-
- maligner tendosynovialer Riesenzelltumor

Neuroektodermale Tumore

- maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST)
- Neuroblastom (inlusieve Ganglioneuroblastom)
- primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)

Tumour of uncertain Differenziation

- Synovialsarkom
- epitheloidzelliges Sarkom
- Klarzelltumor des Weichgewebes
- extraskelettales Chondrosarkom (gut differenziert / myxoid / mesenchymal / undifferenziert)
- desmoplastischer Rundzelltumor

Die Abbildung 1 zeigt die Häufigkeit und Altersverteilung der klinisch relevanten Sarkomentitäten [19].

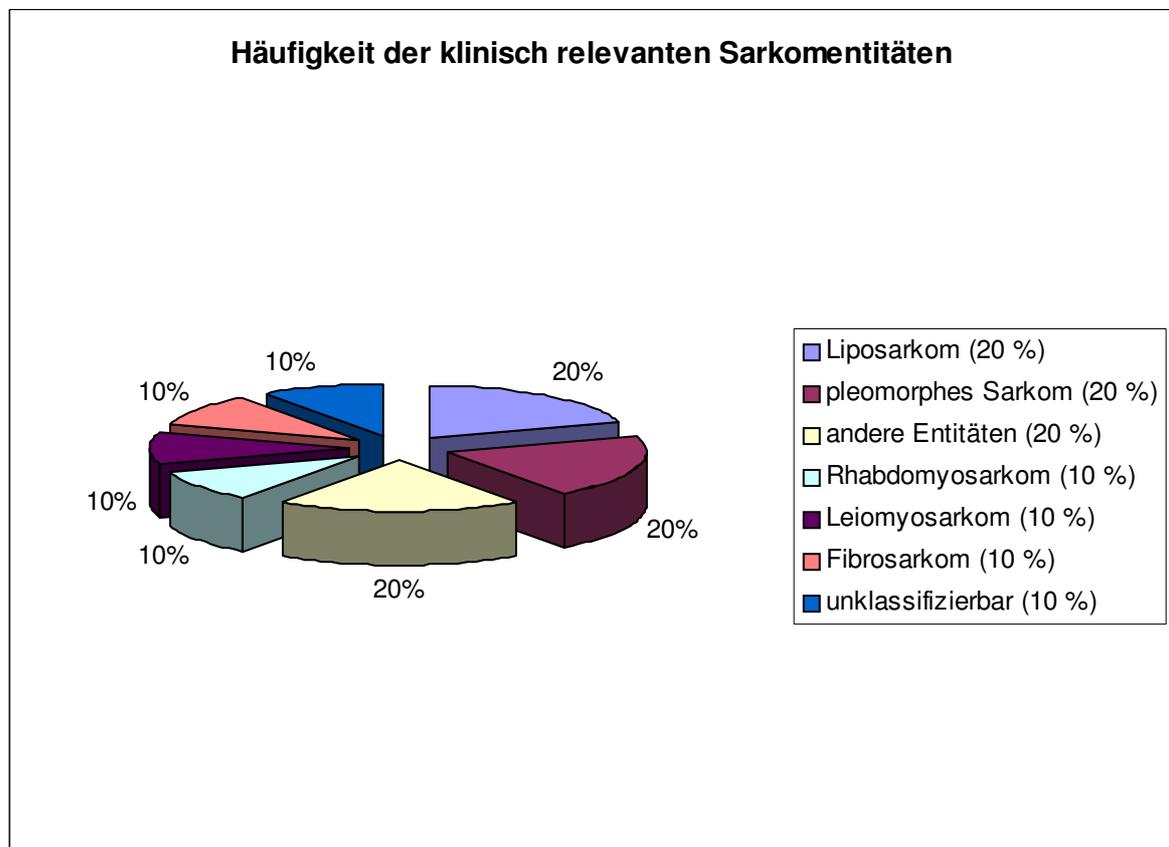


Abbildung 1

Die am häufigsten vorkommenden Weichteilsarkome des Erwachsenen sind Liposarkome (20%) und pleomorphe Sarkome (20%). Mit einer Häufigkeit von jeweils 10% werden Leiomyosarkome (LMS), Rhabdomyosarkome und Fibrosarkome diagnostiziert. (Abbildung 1, Seite 4).

Das häufigste juvenile Weichteilsarkom ist das Rhabdomyosarkom, welches etwa 10% ausmacht.

1.2 Tyrosinkinase-Rezeptoren

Die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren beinhaltet die vier eng miteinander verwandten Proteine EGFR (Synonym HER1), HER2 (Synonym HER2 / neu / c-erbB2), HER3 (Synonym ErbB3) und HER4 (Synonym ErbB4) [53]. Dabei steht HER für human epidermal growth receptor. Es handelt sich um membranständige Rezeptoren mit einem einheitlichen Aufbau. Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einfachen transmembranösen Domäne und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinaseeinheit. Die Bindung spezifischer Liganden (epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF α), amphiregulin, heparin-binding EGF-like growth factor, betacellulin und epiregulin) an die extrazelluläre Bindungsstelle kann in Abhängigkeit vom Reiz zu einer Homomerisierung (EGFR–EGFR) oder zu einer Heteromerisierung (EGFR–HER2) des Rezeptors führen. Diese Rezeptorvereinigung bewirkt eine größere Stabilität des Liganden-Rezeptorkomplexes [53].

In Folge wird über die Tyrosinkinaseaktivierung die Phosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulär gelegenen Effektormoleküle in Gang gesetzt, und es beginnt ein komplexer Signaltransduktionsprozess. Beeinflusst wird damit vor allem die DNA-Transkription, die Proteinbiosynthese und damit schlussendlich das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [38, 53]. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft für die Tyrosinkinaserzeptorfamilie den EGF–Rezeptor.

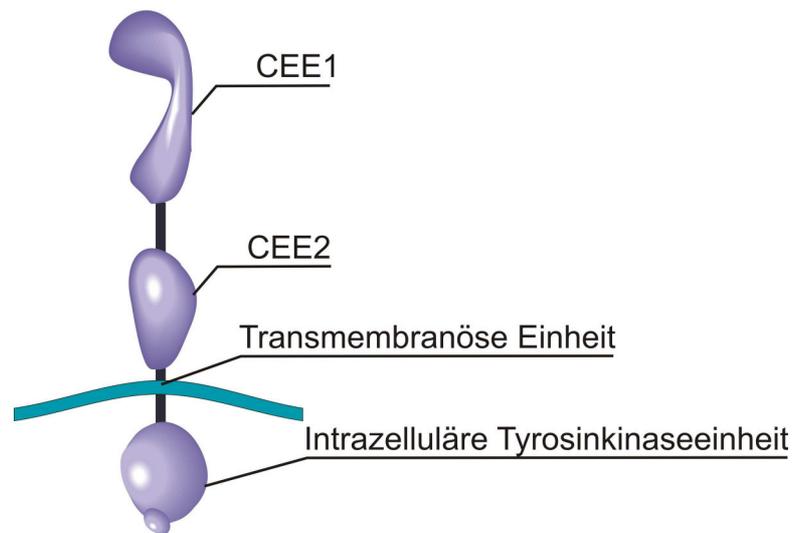


Abbildung 2 Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors

Der Rezeptor ist aus jeweils zwei cysteinreichen extrazellulären Einheiten (CEE 1 und 2), einer transmembranösen Einheit und einer intrazellulären Tyrosinkinaseeinheit (TK) aufgebaut.

1.3 EGFR (HER1)

Der EGF–Rezeptor kann durch bisher sechs verschiedene bekannte Liganden aktiviert werden: epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGFalpha), amphiregulin, heparin-binding EGF-like growth factor, betacellulin und epiregulin [53].

Durch seine Funktion als Signalgeber für Wachstum und Zelldifferenzierung und insbesondere als Therapieziel für die Krebstherapie ist er seit jüngster Zeit in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Zahlreiche Studien zeigen, dass in einer Vielzahl von Tumorentitäten der EGF–Rezeptor in unterschiedlich großer Häufigkeit überexprimiert wird, was den Schluss nahe legte, dass er eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen könnte [68]. Durch in jüngster Zeit entwickelte spezifische Medikamente (zum Beispiel Iressa®) gegen den EGF-Rezeptor, ist es möglich diesen für die Krebsentstehung wichtigen Wachstumsstimulator zu blockieren.

Zu den wichtigsten bisher bekannten EGFR–überexprimierenden Tumoren gehören Karzinome der Mamma [7, 9, 13, 61], des Ovars [4, 31], des Uterus [43, 44], der Schilddrüse [6], der Harnblase [62, 69], des Colons [27, 58], des Oesophagus [30], des Kopf-Halsbereiches [3, 24], der Prostata [37], der Niere [2] der Leber [32], des Pankreas [73], der Haut [35], des Magens [55] und der

Lunge [48]. Auch bei Glioblastomen [21, 25, 52, 57], Astrozytomen [14, 28, 34] und Melanomen [29] konnte eine EGFR-Überexpression nachgewiesen werden.

Auch für Weichteilsarkome konnten eine EGFR-Überexpressionen nachgewiesen werden, insbesondere für folgende Tumore: Synovialsarkomen, endometrialen Stromasarkomen des Uterus, pleomorphen Sarkomen, Fibrosarkomen, malignen peripheren Nervenscheidentumoren, Rhabdomyosarkomen, Ewing Sarkomen, Dermatofibrosarkoma protuberans, Chondrosarkomen, Osteosarkomen, Leiomyosarkomen und Liposarkomen (Tabelle 1, siehe Seite 8).

Sato und Mitarbeiter fanden in den untersuchten Sarkomen (Liposarkom, Leiomyosarkom, Fibrosarkom, pleomorphes Sarkom, Synovialsarkom und maligner peripherer Nervenscheidentumor) eine Korrelation zwischen EGFR-Überexpression und der Größe und Lage des Tumors. Sarkome mit einer EGFR-Überexpression deuteten auf eine schlechte Prognose hin [56].

Die Arbeitsgruppe von Thomas und Mitarbeitern befasste sich mit Synovialsarkomen und konnte zeigen, dass bei diesen Tumoren häufig eine SYT/SSX1 Translokation auf dem Chromosom 18 mit dem Chromosom 11 vorliegt. Dieses wurde beobachtet im Zusammenhang mit einer EGFR-Expression, aber ohne Anhalt für eine Genamplifikation [63]. Unter einer Genamplifikation versteht man Gene oder Genabschnitte, die mehrfach in einem Chromosom vorkommen.

Verschiedene Anstrengungen wurden in den letzten Jahren unternommen, um die durch EGFR gesteuerten Signalwege selektiv zu hemmen. Antikörper wurden entwickelt, die den extrazellulären Teil der Rezeptoren blockieren sollen. Dazu gehören EGFR-Antikörper, wie zum Beispiel IMC-C225 [20] oder der vollständig humanisierte Antikörper ABX-EGF [71], kleine Moleküle, wie zum Beispiel Quinazolon-Derivate (ZD1839, CP-358, OSI-774) [45, 68], Pyrazolo- oder Pyrolo-Pyrimidinen (CGP59326, PKI166, PD1, PD158780) [8, 23, 40] sowie tyrosinkinase-inhibierende EGF-Konjugate [65]. Mit der Verfügbarkeit einer solchen Vielzahl an Anti-EGFR-Medikamenten wurden vor einiger Zeit verschiedene klinische Studien begonnen.

Histologie	Autor	Anzahl (n)	Methode	Anzahl positiv in %
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	Yang et al. 2006 [70]	1	Immunhistochemie	100
	Sato et al. 2005 [56]	18	Immunhistochemie	89
	Gusterson et al. 1985 [26]	2	Immunhistochemie	0
	Nielsen et al. 2003 [46]	5	Immunhistochemie	60
	Dobashi et al. 2004 [17]	1	Immunhistochemie	0
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100
Synovialsarkom	Sato et al. 2005 [56]	42	Immunhistochemie	76,2
	Thomas et al. 2005 [63]	38	Immunhistochemie	55,3
	Yang et al. 2006 [70]	3	Immunhistochemie	66,7
	Perosio et al. 1989 [51]	4	Immunhistochemie	25
	Dobashi et al. 2004 [17]	11	Immunhistochemie	54,5
	Nielsen et al. 2003 [45]	46	Immunhistochemie	52
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100
pleomorphes Sarkom	Yang et al. 2006 [70]	9	Immunhistochemie	77,8
	Perosio et al. 1989 [51]	9	Immunhistochemie	66,7
	Dobashi et al. 2004 [17]	35	Immunhistochemie	14,3
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	0
	Sato et al. 2005 [56]	44	Immunhistochemie	88,6
	Gusterson et al. 1985 [26]	19	Immunhistochemie	95
Rhabdomyosarkom	Dobashi et al. 2004 [17]	7	Immunhistochemie	28,6
	Dobashi et al. 2007 [16]	1	Immunhistochemie	0
	Yang et al. 2006 [70]	1	Immunhistochemie	100
Endometriales Stromasarkom des Uterus	Moinfar et al. 2005 [44]	23	Immunhistochemie	74
Fibrosarkom	Sato et al. 2005 [56]	11	Immunhistochemie	63,6
	Dobashi et al. 2004 [17]	2	Immunhistochemie	0
	Gusterson et al. 1985 [26]	1	Immunhistochemie	100
Leiomyosarkom	Baird et al. 2005 [5]	36	Immunhistochemie	0
	Dobashi et al. 2004 [17]	13	Immunhistochemie	7,7
	Yang et al. 2006 [70]	9	Immunhistochemie	66,7
	Dobashi et al. 2007 [16]	1	Immunhistochemie	0
	Sato et al. 2005 [56]	11	Immunhistochemie	72,7
Liposarkom	Sato et al. 2005 [56]	52	Immunhistochemie	5,8
	Dobashi et al. 2004 [17]	5	Immunhistochemie	20
	Yang et al. 2006 [70]	5	Immunhistochemie	100
	Gusterson et al. 1985 [26]	3	Immunhistochemie	100
Ewing Sarkom	Yang et al. 2006 [70]	7	Immunhistochemie	71,4
Chondrosarkom	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100
Osteosarkom	Dobashi et al. 2004 [17]	20	Immunhistochemie	40
	Dobashi et al. 2007 [16]	3	Immunhistochemie	0
Dermatofibrosarkoma protuberans	Yang et al. 2006 [70]	4	Immunhistochemie	75

Tabelle 1 EGFR-Expression bei Sarkomen aus der Literatur.

Erst kürzlich veröffentlichte Studienergebnisse zeigen, dass Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom in einem weit fortgeschrittenem klinischen

Stadium (IIIB / IV) durch die Therapie mit Erlotinib (Tarceva®), einem spezifischen Tyrosinkinasehemmer, eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erfuhren [18, 36, 59, 64].

Erlotinib wirkt als Tyrosinkinasehemmer, in dem es den EGF-Rezeptor blockiert. Über die Blockierung des Rezeptors wird die Signalübertragung unterbrochen und damit auch die Tyrosinkinaseaktivität innerhalb der Zelle, was zu einer Unterbindung des Tumorzellwachstums führen kann [59].

Gegenwärtig werden als eine mögliche Ursache des Ansprechens auf Anti-EGFR-Medikamente genetische Veränderungen des Rezeptorgens diskutiert [12]. Besonders bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde die EGFR Exon 18-21 Mutation in letzter Zeit intensiv beforscht [41, 49, 50].

Die Studien konnten zeigen, dass Tumore mit einer Exon 18-21 Mutation im EGF-Rezeptor sensibel auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren reagierten. Gleiches gilt offenbar für Tumore mit Vermehrung des EGFR-Gens (Amplifikation) [10]. Somit stellt die Antikörpertherapie (zum Beispiel Gefitinib®) gegen den EGF-Rezeptor bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nur im Falle einer Mutation oder Amplifikation, neben der chirurgischen Intervention, eine weitere Therapieoption dar [10, 11].

Für Sarkome gibt es bisher eine Studie aus dem Jahre 2005 von Baird und Mitarbeitern, die Exonmutationen in den EGFR-exprimierenden Sarkomen untersuchten. Es konnten keine 18-21 Mutationen nachgewiesen werden. Amplifikationen des EGF-Rezeptors wurden nicht untersucht [5].

1.4 Tissue Microarray (TMA)

Die seit circa 10 Jahren erprobte Tissue Microarray-Technik (Gewebe-Mikro-Array-Technik) ermöglicht es, bis zu 1000 Gewebeproben (zum Beispiel Tumore) mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Techniken auf einem Objektträger zu untersuchen [60].

Dazu werden 0,6mm durchmessende Zylinder aus ursprünglich in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (so genannten Spenderblöcken) herausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock (so genannten Empfängerblock) eingebracht. Bis zu 1000 solcher Gewebezyylinder können in einem einzigen Empfängerblock

eingebraucht werden. So ist es möglich, mit nur einem einzigen Untersuchungsschnitt, bis zu 1000 Gewebeproben zu untersuchen [42, 47].

1.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Um quantitative Nachweise eines Gens in Zellkernen durchführen zu können, hat sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als geeignetes Verfahren erwiesen. Als Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bezeichnet man Verfahren, die den Nachweis von DNA-Sequenzen auf den Chromosomen erlauben. Hierbei muss zunächst die Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA überführt werden. Danach erfolgt die Hybridisierung mit der komplementären DNA-Sequenz. Diese Sonden können entweder durch weitere Antikörperbindungen in einem weiteren Schritt sichtbar gemacht werden oder, wie in dieser Arbeit, Fluorochrommarkierungen tragen. Die markierten Sonden sind nun unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop sichtbar, welches die Signale verstärkt. Für den Nachweis einer spezifischen Genamplifikation benötigt man eine Sonde des nachzuweisenden Gens und eine weitere Sonde mit der die Zentromerregion des Chromosoms nachgewiesen werden kann. So ist es möglich, die Häufigkeit beider Signale zu bestimmen und den Quotienten zu ermitteln.

1.6 Polymerase-chain-reaktion (PCR)

Diese Standardmethode, die 1984 von Kary Mullis veröffentlicht wurde, ist ein Verfahren zur in vitro Amplifizierung (Vermehrung) von spezifischen DNA-Sequenzen. Hierbei wird zunächst der Nukleinsäuredoppelstrang denaturiert und anschließend 15–25 Basen lange Oligonukleotide hinzugesetzt, die den beiden Einzelsträngen komplementär sind und als Primer fungieren. Durch Zusatz einer DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschließend wiederholt sich derselbe Reaktionszyklus, welcher aus Denaturierung, Anheftung der Oligonukleotide sowie Extension zu neuen Doppelsträngen besteht. Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA Moleküle [39].

2 Ziel- und Fragestellung

Tyrosinkinase sind die heute am besten etablierten Therapiezielproteine bei malignen Tumoren überhaupt. Die heute erfolgreichsten genspezifischen Krebsmedikamente wie Herceptin® (Zielrezeptor: HER2), Glivec® (Zielrezeptor: KIT / PDGFR) oder Iressa® (Zielrezeptor: EGFR) hemmen jeweils spezielle Tyrosinkinase. Eine EGFR-Überexpression wurde verschiedentlich bei Sarkomen beschrieben, so dass ein erfolgreicher Einsatz von Anti-EGFR-Medikamenten bei diesen Tumoren denkbar wäre. Eigentlich prädiktiv für diese Medikamente sind aber DNA-Veränderungen und nicht eine immunhistochemisch messbare Überexpression.

Über eine EGFR-Amplifikation in menschlichen Sarkomen ist aber bisher nichts bekannt. Auch die Häufigkeit der therapiebedeutsamen Mutationen des EGFR im Exon 18-21 in menschlichen Sarkomen ist unbekannt.

Ziel dieser Dissertation ist es, 504 menschliche primäre Sarkome - einschließlich deren Rezidive und Metastasen - in einem, im Rahmen dieser Arbeit angefertigten, Tissue-Microarray auf EGFR Veränderungen zu untersuchen.

Spezielle Aufgabenstellung:

1. Es soll die Häufigkeit von EGFR-Amplifikationen und Überexpressionen in verschiedenen Sarkomtypen, mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, ermittelt werden.
2. Darüber hinaus soll das Vorkommen von Exon 18-21 Mutationen in EGFR amplifizierten Sarkomen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientengut

Für das Patientenkollektiv - in einer Größe von 504 Fällen - wurde auf formalinfixierte paraffineingebettete Tumorgewebe aus den Jahren 1993 bis 2005 des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter) zurückgegriffen.

3.2 Pathologie und Befunde

Von jedem Tumor wurden die Pathologieberichte durchgesehen. Dabei wurden soweit vorhanden, folgende Daten entnommen: Tumorlokalisierung, histologischer Grad, Geschlecht und Alter. Ferner wurde für jeden Fall geklärt, ob es sich um einen Primärtumor, ein Rezidiv oder eine Metastase handelt.

3.3 Herstellung des Tissue Microarray

Für die Untersuchung wurde ein Tissue Microarray erstellt, der aus zwei TMA - Tumorblöcken bestand. Die histologische Zusammensetzung des Tissue Microarrays ist aus Tabelle 2 zu entnehmen. Die Herstellung dieses TMAs erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Elisa von Friderici [22] (Häufigkeiten sowie prognostische Bedeutung von BCL2 Amplifikationen und p53 Alterationen bei menschlichen Sarkomen, deren Rezidiven und Metastasen (noch nicht publiziert)).

Tumorentitäten	Gesamtanzahl einer Entität	Primarii	Metastasen	Rezidiv
Angiosarkom	16	9	2	5
Chondrosarkom	12	5	4	3
Dermatofibrosarkoma protuberans	12	6	1	5
Desmoid	27	20	0	7
Ewing Sarkom	7	5	2	0
Fibrosarkom	4	1	2	1
Gastrointestinaler Stromatumor	76	61	14	1
Granularzelltumor	21	20	0	1
Hämangioperizytom	16	9	4	3
Leiomyosarkom	90	49	30	11
Liposarkom	81	55	5	21
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	44	19	14	11
Pleomorphes Sarkom	72	42	12	18
Osteosarkom	9	4	3	2
primitiver neuroektodermaler Tumor	7	3	2	2
Rhabdomyosarkom	7	4	1	2
Synovialsarkom	3	1	2	0
Gesamtzahl aller Entitäten	504	313	98	93

Tabelle 2 Tumorentitäten des TMA-Sarkom, gegliedert in Gesamtanzahl einer jeden Entität und in Primarii, Metastasen und Rezidive.

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 (siehe Seite14) zeigen das Array-Stanzgerät. Es besteht aus zwei an der Spitze geschärften Hohlzylindern. Der kleinere Hohlzylinder hat einen äußeren Durchmesser von 0,6mm und wird benötigt, um

Löcher in die Empfängerblöcke zu stanzen. Der größere Hohlzylinder dient dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus den Donatorblöcken. Er hat einen Innendurchmesser von 0,6mm und entspricht dem äußeren Durchmesser des kleinen Hohlzylinders. Er überführt die Tumorgewebezylinder in die vorgestanzten Löcher der Empfängerblöcke. Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock.



Abbildung 3.1

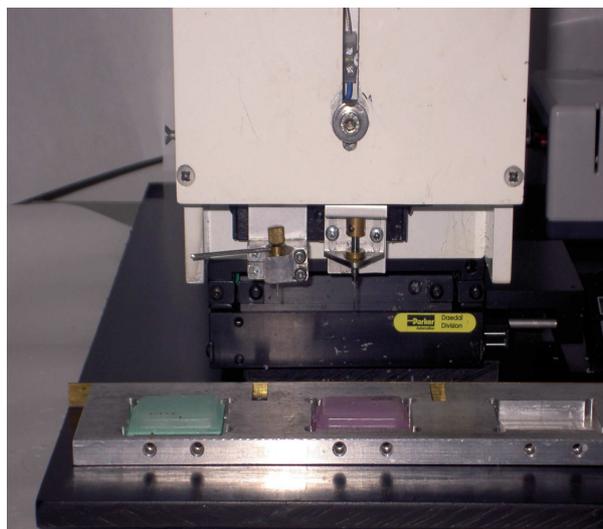


Abbildung 3.2

Abbildung 3.1 Übersicht mit Computer (Stanzsoftware)

Abbildung 3.1 Detailaufnahme der zwei Hohlzylinder. Erklärung siehe Text oben.

In den folgenden Abbildungen (4.1 / 4.2 / 4.3) ist die Weiterverarbeitung der TMA-Blöcke dargestellt.

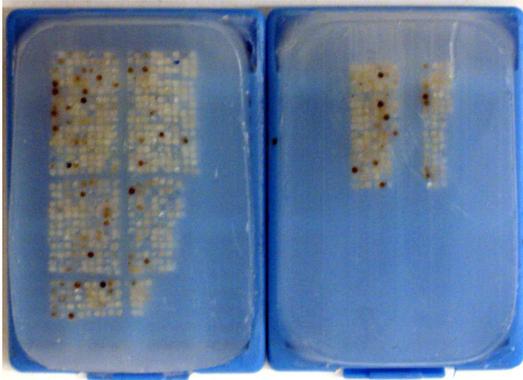


Abbildung 4a

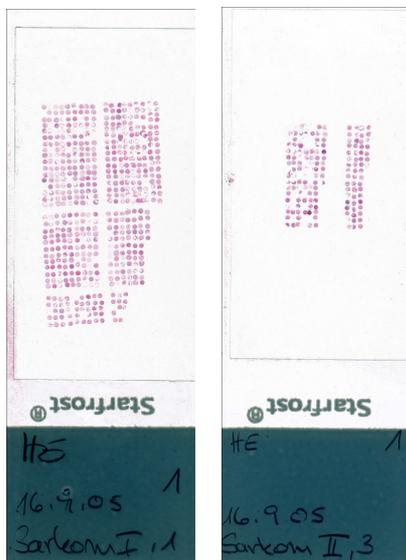


Abbildung 4b



Abbildung 4c

Abbildung 4a Zeigt die beiden fertig gestanzten TMA-Blöcke.

Abbildung 4b Blick auf die HE gefärbten Schnitte der TMA-Blöcke.

Abbildung 4c Zeigt einen HE gefärbten Einzelspot eines TMA-Blocks durch ein Mikroskop (10fache Vergrößerung).

3.4 Immunhistochemie (IHC)

Für die immunhistochemische Untersuchung der TMAs wurde der Antikörper EGFR-pharmDx™ der Firma DAKO (Glostrup, Dänemark) verwendet. Die TMA Schnitte wurden zunächst 1 Stunde in Xylol deparaffiniert und danach in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest bei Raumtemperatur behandelt. Der Antikörper wurde für negative Kontrollen weggelassen. Als positive Kontrollen verwendeten wir Gewebe mit bekannter EGFR-Expression. Die Weiterverarbeitung des Präparates wurde mit dem EGFR-pharmDx™ Kit nach den Verfahrensanweisungen des Herstellers durchgeführt. Für die Auswertung wurden nur membranöse EGFR-Anfärbungen berücksichtigt. Für jeden Tumor wurde die Zahl der positiven Zellen und die Intensität der Färbung (semiquantitativ entsprechend einem Score von 0 - 3+) geschätzt. Die Tumore wurden anschließend in folgende Kategorien eingeteilt: negativ (keine Färbung), stark positiv (100% - 50 % = 2+ oder 50% - 30% = 3+), schwach positiv (Immunfärbung vorhanden, aber ungenügend um die Kriterien für starke Positivität zu erreichen, also unter 30% der gesamten Zellen).

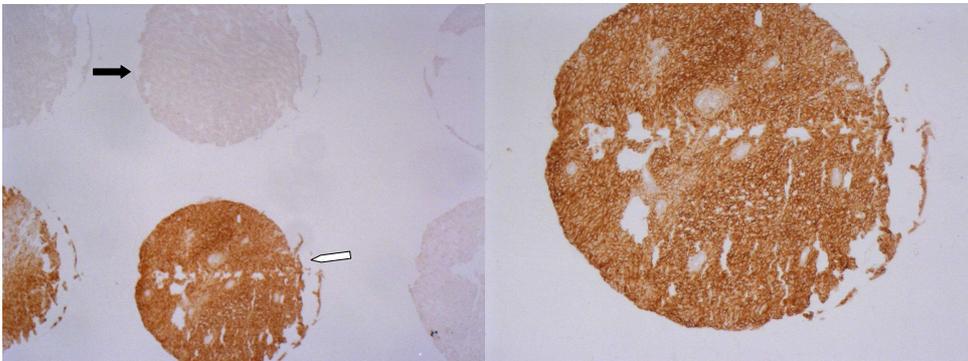


Abbildung 5a

Abbildung 5b

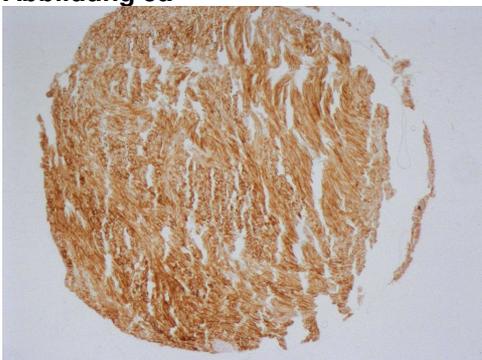


Abbildung 5c

Abbildung 5.a: IHC-Färbung eines MPNST mit starker EGFR-Proteinexpression (◻→) und eines Liposarkoms ohne EGFR-Proteinexpression (◼→) bei 5facher Vergrößerung.

Abbildung 5b und c : IHC-Färbung zweier MPNST mit EGFR-Proteinexpression bei 10facher Vergrößerung.

3.5 Fluoreszenz–in–situ-Hybridisierung (FISH)

Für die TMA–Schnitte wurden LSI® EGFR SpectrumOrange Sonden und CEP SpectrumGreen Sonden der Firma Vysis (Downers Grove, IL, USA) verwendet.

Die Vorbehandlung dient der Entfernung des Paraffins, der teilweisen Entfernung von Proteinen und der Degradierung von Nukleasen. Der Restverdau der Proteine geschieht vor allem durch Proteasen, die die Zugänglichkeit der DNA verbessern und die Eigenfluoreszenz des Gewebes erheblich verringern.

Die Paraffinvorbehandlung mit dem Paraffin Pretreatment Kit (Vysis) wurde wie folgt durchgeführt:

- 3 x 10 Minuten Xylolbad
- 2 x 5 Minuten 95% Ethanolbad
- 3 Minuten Lufttrocknen bei 45 °C
- 15 Minuten in der Pretreatment-Lösung bei 80 °C vorbehandeln
- 2 Minuten Wasserbad
- 70 Minuten Proteaselösung (Vysis) bei 37 °C
- 2 Minuten Wasserbad
- 3 Minuten 70% Ethanolbad
- 3 Minuten 80% Ethanolbad
- 3 Minuten 95% Ethanolbad
- 3 Minuten Lufttrocknen 45 °C

In den folgenden Schritten wird der DNA–Doppelstrang in zwei Einzelstränge denaturiert, um danach die Hybridisierung mit den Gensonden (Probe) zu ermöglichen.

FISH: Tag 1

- auf trockene entparaffinierte Schnitte 10–20ul (je nach Schnittgröße) der Probe pipettieren, mit Deckglas eindecken und Ränder mit Rubbement abdichten
- Schnitte bei 72 °C auf der Heizplatte oder Hybrite 5 Minuten denaturieren

-
- Schnitte bei 37°C in feuchter Kammer, Inkubator oder Hybrite inkubieren.

FISH: Tag 2

- Küvette Waschpuffer 1 vorheizen 75 °C (Waschpuffer: 2 x SSC, 0,3% NP 40, ph 7-7.5)
- Küvette mit Waschpuffer 2 auf Raumtemperatur bringen
- Küvette mit Wasser bereithalten
- Präparate abdecken in Waschpuffer 2 rasch waschen
- 2 Minuten im Waschpuffer 1 inkubieren
- im Wasser rasch waschen
- lufttrocknen
- mit Dapi - II (4', 6 - Diamidino – Phenyldole der Firma Vysis) eindecken, Deckglas 24 x 50mm

Die Signalauswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem geeigneten Rot- und Grün-Multi-Bandpass-Filterset ausgestattet war. Es wurden jeweils 10 Tumorzellkerne einer jeden Tumorstanze des Tissue-Microarray bei 1000-facher Vergrößerung (in Ölimmersion) evaluiert, wobei in dem Zellkern die Anzahl roter und grüner Signale gezählt wurde. Dabei entsprach jeweils ein rotes Signal einem EGFR-Genamplikon, ein grünes Signal markierte dagegen jeweils die zugehörige Zentromerregion des Chromosoms 7. Eine Genamplifikation wurde angenommen, wenn der durchschnittliche Quotient von roten zu grünen Signalen (bezogen auf alle 10 ausgewerteten Zellen) größer 2,0 war. Die folgenden Beispielbilder zeigen Amplifikationen beim malignen peripheren Nervenscheidentumor sowie zwei Polysomien und normale EGFR-Gen/Zentromer – Verhältnisse beim Liposarkom.

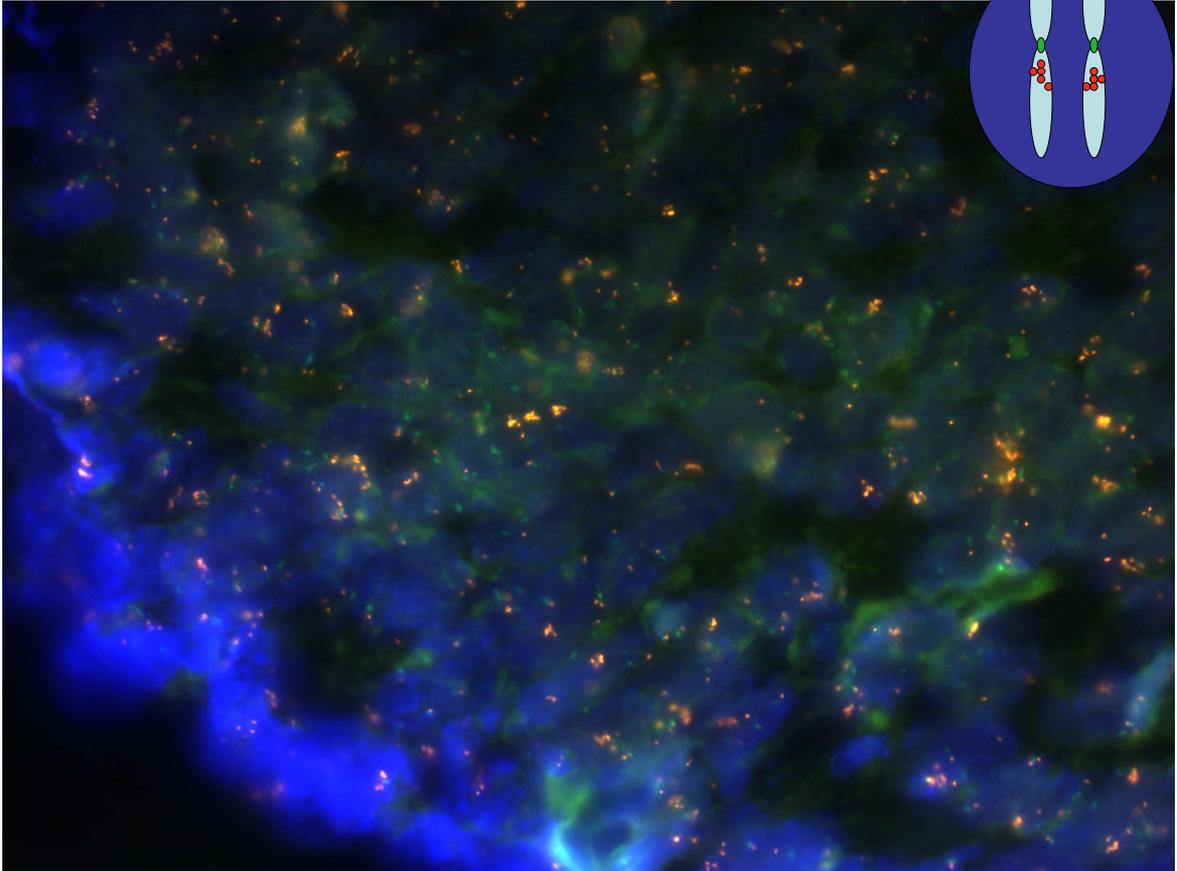


Abbildung 6: Nachweis von EGFR - Amplifikationen eines malignen peripheren Nervenscheidentumors in FISH-Technik. Das Amplikon zeigt sich hier als rotes Signal, während das grüne Signal die Zentromerregion des Chromosoms 7 markiert.

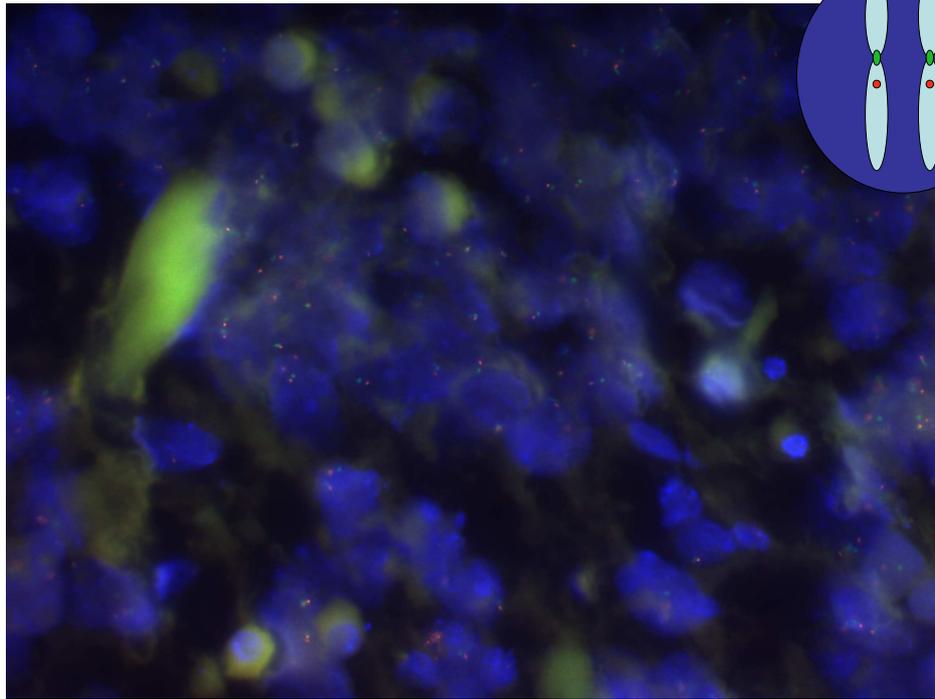


Abbildung 7a

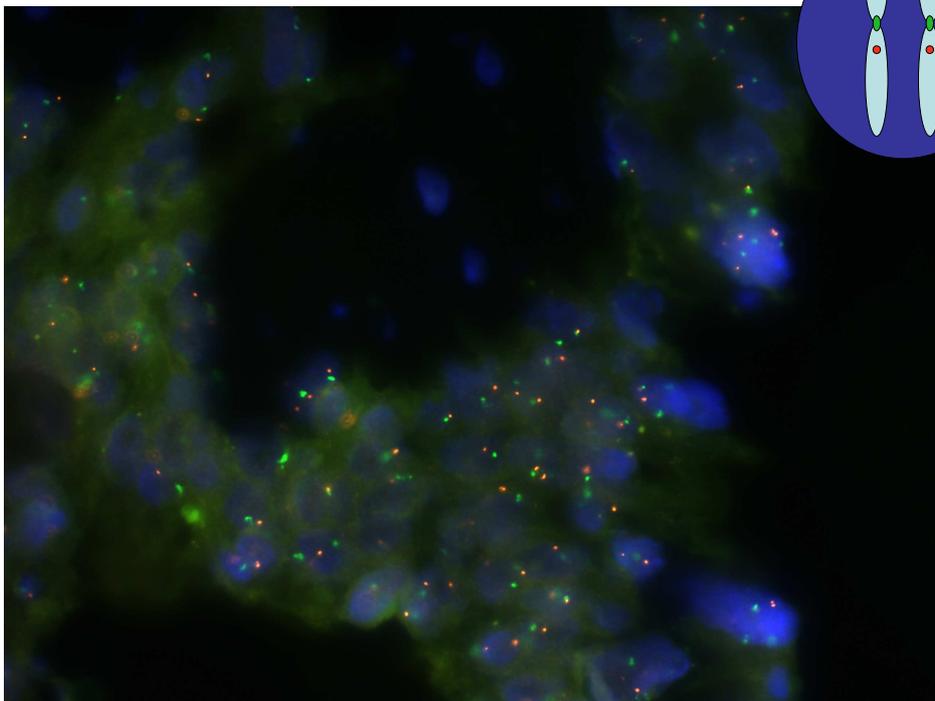


Abbildung 7b

Abbildung 7 a und b: Normale Genkopiezahl zweier Liposarkome in FISH -Technik. Das EGFR - Gen zeigt sich hier als rotes Signal, während das grüne Signal die Zentromerregion des Chromosoms 7 markiert.

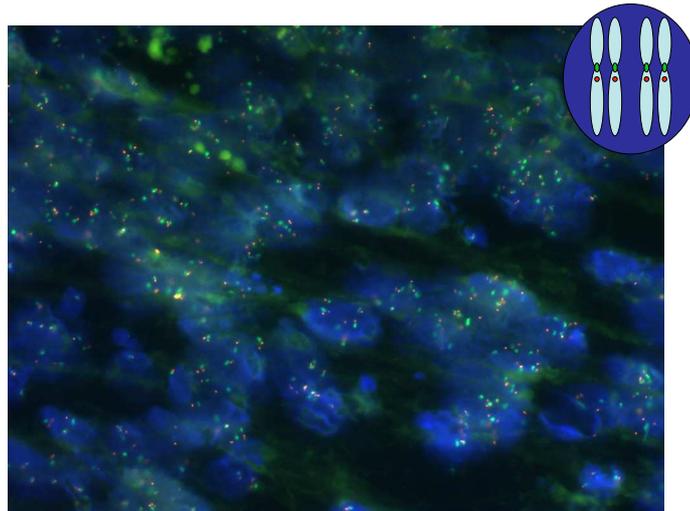


Abbildung 8a

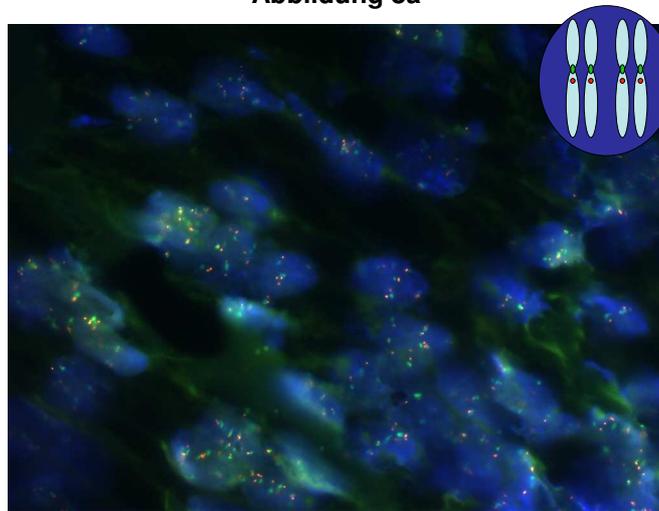


Abbildung 8b

Abbildung 8 a und b: Polysomie bei zwei Liposarkomen in FISH-Technik. Die roten Signale zeigen das EGFR-Gen, während die grünen Signale die Zentromerregion des Chromosoms 7 markieren.

3.6 Exon–Mutations Analyse mittels Polymerase–chain–reaktion (PCR)

Die EGFR–Sequenzierung wurde durch die Mitarbeiter der Molekularpathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (PD Dr. R. Simon) nach dem modifizierten Protokoll von Lynch und Mitarbeitern [41] durchgeführt.

Kurz zusammengefasst wurde das DNA-Material aus den Tumorblöcken für die PCR wie folgt gewonnen:

- 1.) 4µm Gewebeschnitte (einer je Tumorblock) wurden auf folienbeschichtete Objektträger aufgezogen und mit Xylol (2x Xylolbad 2x Ethanolbad) entparaffiniert
- 2) Hämatoxilin-färbung

-
- 3) Tumorzellen am Lasermikrodissektionsgerät (PALM) herauslasern und in PALM-Tube® Deckeln sammeln.
 - 4) Zellen mit 50ul PCR Puffer aufnehmen
 - 5) 5ul Proteinase K-Lösung (600mAU / ml) zugeben und bei 56°C über Nacht inkubieren
 - 6.) Nochmals 5ul Proteinase Lösung zugeben, 2 Stunden bei 56°C weiterinkubieren. Anschließend Proteinase durch Erhitzen (Thermocycler, 10 Minuten bei 95°C) inaktivieren.
 - 7.) Von dem Rohverdau werden 3-5ul für einen PCR-Ansatz eingesetzt

Die Annealingtemperatur betrug bei allen untersuchten Exons 58°C bei 60 PCR Zyklen. Die PCRs wurden mit einem PTC 100 Cycler ®(MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

Die verwendeten Primer:

Exon 18 forward CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC

Exon 18 reverse GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC

Exon 19 forward GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC

Exon 19 reverse CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG

Exon 20 forward CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC

Exon 20 reverse CATATCCCATGGCAAACCTTGC

Exon 21 forward CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC

Exon 21 reverse GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG

Die für die Sequenzierung benötigte Menge der PCR Produkte wurde mit 200ul 0,3 M Natriumacetat und 500ul Ethanol gefällt, erneut mit Wasser aufgenommen und unter Zugabe von 10pmol Primer mit dem BigDye Terminator Kit® (Applied Biosystems Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) eine Cycle Sequencing Reaktion mit 40 Zyklen durchgeführt. Nach einer erneuten Fällung wurden die Ansätze mit Formamid gelöst und mit dem 3100 Genetic Analyser® (Applied Biosystems Applied Biosystems) sequenziert.

Die Polymerasekettenreaktion ist seit den 80er Jahren ein etabliertes Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung definierter Genabschnitte.

Sie ist heute essentieller Standard molekulargenetischer Forschung und soll aus diesem Grund hier nicht weiter erläutert werden.

4 Ergebnisse

4.1 FISH

Die Anzahl der mit FISH auswertbaren Spots betrug 416 (82,5%). FISH-assoziierte Probleme wie Gewebeschäden oder schwache Hybridisierung waren für etwa 55 der nicht ergebnisbringenden Fälle verantwortlich. Der Rest war durch Probleme mit der TMA – Technik, wie beispielsweise zu wenig Tumorzellen in den gestanzten Gewebespots oder sogar durch komplettes Fehlen der Tumorprobe bedingt. Die vollständigen FISH – Ergebnisse sind in Tabelle 4 (siehe Seite 27) dargestellt.

Im Einzelnen fand sich in 403 Tumoren (96,9%) ein normaler FISH–Befund. In 5 malignen Weichteiltumoren konnte eine Amplifikation nachgewiesen werden. In 8 weiteren Sarkomen zeigte sich eine Polyploidie. Die primär als amplifiziert beziehungsweise polyploid diagnostizierten Gewebespots wurden zur Kontrolle nochmals auf Großflächenschnitten untersucht. Auf diesem Weg konnte das gesamte Tumoreinzelpräparat evaluiert werden.

Alle im TMA - Block beobachteten Amplifikationen bestätigten sich im Großflächenschnitt. Dabei fand sich in den Tumoren keinerlei Heterogenität.

Die 17 verschiedenen Entitäten, die insgesamt 504 Weichteiltumore ausmachten, teilten sich auf in 313 Primarii, 98 Metastasen und 93 Rezidive.

Lediglich beim malignen peripheren Nervenscheidentumor und beim Leiomyosarkom konnte eine Amplifikation nachgewiesen werden. Von den insgesamt 44 auswertbaren malignen peripheren Nervenscheidentumoren (19 Primärtumore, 14 Metastasen und 11 Rezidive) zeigten vier Tumore eine Amplifikation und einer eine Polyploidie. Als Beispiel für einen amplifizierten Tumor ist in Abbildung 6 ein MPNST dargestellt (siehe Seite 19).

In der Gruppe der Leiomyosarkome (n=90) konnten ein hoch amplifizierter und zwei polyploide Tumore gefunden werden. Sie alle stammten von verschiedenen Patienten. Das amplifizierte Leiomyosarkom hatte ein EGFR/Zentromer 7 Verhältnis von 15,8/3,0.

Tabelle 3 zeigt die Befunde amplifizierter Tumore im Detail.

Fall	Histologie	Tumor	EGFR - Signale	Chromosom 7 – Signale	Ratio EGFR/Chromosom 7
1	maligner peripherer Nervenscheidentumor	Metastase	9 – 24 ; 14,2	2 – 7 ; 6,0	2,4
2	maligner peripherer Nervenscheidentumor	Primarius	5 - 13 ; 8,8	2 – 6 ; 3,5	2,5
2	maligner peripherer Nervenscheidentumor	Rezidiv	5 – 14 ; 8,7	1 – 6 ; 3,0	2,9
3	maligner peripherer Nervenscheidentumor	Rezidiv	7 - 15 ; 9,0	2 – 6 : 3,2	2,8
4	Leiomyosarkom	Metastase	4 – 50 ; 15,8	2 – 7 ; 3,0	5,2

Tabelle 3: Zeigt die Amplifikationen der untersuchten Sarkome und ihre Verteilung. EGFR- und Chromosom 7–Signale sind mit Range und Durchschnitt angegeben. Aus den EGFR–Signalen und den Signalen der Zentromerregion des Chromosoms 7 errechnet sich der Quotient (Ratio).

Beim Fall 2 (maligner peripherer Nervenscheidentumor) fand sich sowohl im Primarius als auch in seinem Rezidiv eine nahezu gleich starke Amplifikation.

Als Weichteilsarkome mit einer Polyploidie für das Chromosom 7 konnten zwei Liposarkome, ein maligner peripherer Nervenscheidentumor, ein gastrointestinaler Stromatumor, ein Granularzelltumor, ein Angiosarkom und zwei Leiomyosarkome identifiziert werden.

Bei den Liposarkomen handelte es sich um einen Primarius und ein Rezidiv des gleichen Patienten. Der Primarius zeigte ein EGFR/Chromosom 7 Verhältnis von 8,7/8,7, während das Rezidiv mit einem Verhältnis von 4,7/4,6 niedrig polyploid war.

Die zwei polyploiden Leiomyosarkome stammten von unterschiedlichen Patienten. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

4.2 EGFR–Expression

Die EGFR–Expression konnte bei 474 von 504 (94,0%) der Tumorgewebe bestimmt werden.

Insgesamt war eine (Über-) Expression von EGFR deutlich häufiger als eine EGFR-Genkopiezahlveränderung (Amplifikation). 428 (90,3%) der auswertbaren Gewebeproben waren EGFR negativ, 26 (5,5%) zeigten eine schwache und 20 (4,2%) eine starke Positivität. In den Primärtumoren fand sich eine starke EGFR-Expression insbesondere in malignen peripheren Nervenscheidentumoren (31,6% der auswertbaren Primärtumoren), pleomorphen Sarkomen (8,3% der auswertbaren Primärtumoren) und Leiomyosarkomen (6,9% der auswertbaren Primärtumoren).

Bei den hier untersuchten Metastasen und Rezidiven zeigte sich beim malignen peripheren Nervenscheidentumor bei 14,3% der auswertbaren Metastasen und bei 18,2% der auswertbaren Rezidive eine starke EGFR-Expression. Beim pleomorphen Sarkom waren 2,7% der Rezidive schwach positiv. Beim Leiomyosarkomen konnte lediglich eine schwach positive EGFR-Expression bei 7,1% der Metastasen und 9,1% der Rezidive gezeigt werden. Die immunhistochemischen Daten sind in der Tabelle 4 (siehe Seite 27) zusammengefasst.

4.3 EGFR-Expression bei den amplifizierten und polyploiden Weichteilsarkomen

Bei den amplifizierten malignen peripheren Nervenscheidentumoren konnte von einem Patienten Primärtumor und Rezidiv beurteilt werden. Beide Tumore zeigten eine etwa gleich starke EGFR-Expression. Bei zwei weiteren amplifizierten malignen peripheren Nervenscheidentumoren handelte es sich jeweils um ein Rezidiv und eine Metastase von unterschiedlichen Patienten. Beide zeigten eine starke EGFR-Expression.

Bei dem amplifizierten Leiomyosarkom konnte keine EGFR-Expression nachgewiesen werden.

Die polyploiden Liposarkome zeigten sowohl bei dem Primärtumor als auch bei dem Rezidiv eines Patienten, keine EGFR-Expression.

Der polyploide maligne periphere Nervenscheidentumor hingegen zeigte eine starke EGFR-Expression.

Bei weiteren als polyploid diagnostizierten Weichteilsarkomen (Leiomyosarkom, Granularzelltumor, Gastrointestinaler Stromatumor und Angiosarkom) konnte keine EGFR-Expression gezeigt werden. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

4.4 EGFR-Mutation

Bei den fünf Tumoren mit EGFR-Amplifikation wurde eine Exon 18-21 Mutationsanalyse mittels PCR durchgeführt.

Die Untersuchung konnte aber keine Mutation des EGF-Rezeptors zeigen.

Tumorart		DNA – Kopiezahl						HER1 Expression			
		Anzahl Proben	HER1		Chromosom 7		18-21 Mutation	auswertbar	negativ [%]	schwach [%]	stark [%]
			auswertbar	Amplifiziert [%]	auswertbar	Polysomie [%]					
Leiomyosarkom (n=90)	Primarius	49	44	2,3	44	2,3	0	49	86,2	6,9	6,9
	Metastase	30	26	0	26	3,8	0	28	92,9	7,1	0
	Rezidiv	11	10	0	10	0	0	11	90,9	9,1	0
maligner peripherer Nervenscheidentumor (n=44)	Primarius	19	19	5,3	19	0	0	19	63,1	5,3	31,6
	Metastase	14	14	7,1	14	7,1	0	14	71,4	14,3	14,3
	Rezidiv	11	11	18,2	11	0	0	11	72,7	9,1	18,2
Dermatofibrosarkoma protuberans (n=12)	Primarius	6	5	0	5	0	0	6	100	0	0
	Metastase	1	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	Rezidiv	5	5	0	5	0	0	4	100	0	0
Desmoid (n=27)	Primarius	20	18	0	18	0	0	20	100	0	0
	Metastase	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	Rezidiv	7	7	0	7	0	0	6	100	0	0
Ewing Sarkom (n=7)	Primarius	5	5	0	5	0	0	5	100	0	0
	Metastase	2	2	0	2	0	0	2	100	0	0
	Rezidiv	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
Fibrosarkom (n=4)	Primarius	1	1	0	1	0	0	1	100	0	0
	Metastase	2	2	0	2	0	0	2	100	0	0
	Rezidiv	1	1	0	1	100	0	1	100	0	0
Gastrointestinaler Stromatumor (n=76)	Primarius	61	56	0	56	0	0	57	100	0	0
	Metastase	14	14	0	14	0	0	13	100	0	0
	Rezidiv	1	1	0	1	0	0	1	100	0	0
Granularzelltumor (n=21)	Primarius	20	17	0	17	5,9	0	20	95	0	5
	Metastase	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	Rezidiv	1	1	0	1	1	0	1	100	0	0
Hämangioperizytom (n=16)	Primarius	9	9	0	9	0	0	9	100	0	0
	Metastase	4	3	0	3	0	0	4	75	0	25
	Rezidiv	3	2	0	2	0	0	3	100	0	0

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

Tumorart	DNA – Kopiezahl						HER1 Expression				
	Anzahl Proben	HER1		Chromosom 7		18-21 Mutation	HER1 Expression				
		auswertbar	amplifiziert [%]	auswertbar	Polysomie [%]		auswertbar	negativ [%]	schwach [%]	stark [%]	
Angiosarkom (n=16)	Primarius	9	8	0	8	12,5	0	8	100	0	0
	Metastase	2	2	0	2	0	0	2	100	0	0
	Rezidiv	5	4	0	4	0	0	5	100	0	0
Liposarkom (n=81)	Primarius	55	46	0	46	2,2	0	51	86,3	13,7	0
	Metastase	5	4	0	4	0	0	5	100	0	0
	Rezidiv	21	16	0	16	6,2	0	21	96,1	0	3,9
Chondrosarkom (n=12)	Primarius	5	3	0	3	0	0	4	100	0	0
	Metastase	4	3	0	3	0	0	3	100	0	0
	Rezidiv	3	3	0	3	0	0	3	66,7	33,3	0
Pleomorphes Sarkom (n=72)	Primarius	42	28	0	28	0	0	36	77,9	13,8	8,3
	Metastase	12	9	0	9	0	0	10	100	0	0
	Rezidiv	18	10	0	10	0	0	16	97,3	2,7	0
Osteosarkom (n=9)	Primarius	4	1	0	1	0	0	4	75	25	0
	Metastase	3	0	0	0	0	0	3	66,7	33,3	0
	Rezidiv	2	0	0	0	0	0	1	0	100	0
Primitiver neuroektodermaler Tumor (n=7)	Primarius	3	1	0	1	0	0	2	100	0	0
	Metastase	2	1	0	1	0	0	2	50	0	50
	Rezidiv	2	1	0	1	0	0	2	100	0	0
Rhabdomyosarkom (n=7)	Primarius	4	1	0	1	0	0	4	100	0	0
	Metastase	1	0	0	0	0	0	1	100	0	0
	Rezidiv	2	0	0	0	0	0	2	100	0	0
Synovialsarkom (n=3)	Primarius	1	1	0	1	0	0	1	100	0	0
	Metastase	2	1	0	1	0	0	1	100	0	0
	Rezidiv	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0

Tabelle 4: Zusammenfassung der FISH- und immunhistochemischen Resultate von 504 untersuchten humanen Weichteilsarkomen.

5 Diskussion

Die Untersuchung von mehr als 470 Weichteilsarkomen ergab, dass eine Überexpression des EGFR-Gens bei Sarkomen verhältnismäßig selten vorkommt und dabei insbesondere beim malignen peripheren Nervenscheidentumor gefunden werden kann. Dieser Befund passt zu früheren Studien, die ebenfalls eine EGFR-Expression bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren gefunden hatten [16, 17, 26, 46, 56, 70].

Die in vorherigen Untersuchungen gefundene Häufigkeit der EGFR-Positivität bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren ist in Tabelle 5 dargestellt.

Histologie	N (Fälle)	EGFR-	
		Expression in %	Autor
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	1	100	Yang et al. 2006 [70]
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	18	89	Sato et al. 2005 [56]
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	2	0	Gusterson et al. 1985 [26]
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	5	60	Nielsen et al. 2003 [46]
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	2	100	Dobashi et al 2007 [16]
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	1	0	Dobashi et al 2004 [17]

Tabelle 5 Anzahl (n) der untersuchten malignen peripheren Nervenscheidentumore und Häufigkeit der EGFR-Expression in Prozent.

Die Häufigkeit einer EGFR-Expression wurde in diesen Studien von 0 bis 100% angegeben. Dies ist ein weiteres Beispiel für die nur schlechte Vergleichbarkeit immunhistochemischer Daten verschiedener Laboratorien. Auch bei verschiedenen anderen Sarkomarten konnte in Einzelfällen eine meist schwache EGFR-Expression gefunden werden. Eine starke EGFR-Expression fand sich neben dem malignen peripheren Nervenscheidentumor in unserer

Arbeit und mit unserem Immunhistochemieassay lediglich noch bei Leiomyosarkomen, Liposarkomen, Hämangioperizytomen, pleomorphen Sarkomen, Granularzelltumoren und dem primitiven neuroektodermalen Tumor. In anderen Arbeiten waren häufige EGFR-Expressionen auch bei Synovialsarkomen, pleomorphen Sarkomen, Fibrosarkomen, Ewing Sarkomen, Chondrosarkomen, dem Dermatofibrosarkoma protuberans und Rhabdomyosarkomen beschrieben worden. Die Häufigkeiten lagen hier im Mittelwert jeweils zwischen 56,4 und 100 Prozent (Tabelle 6, siehe Seite 31).

Die Abweichung zu den Ergebnissen unserer Studie kann durch Unterschiedlichkeiten der immunhistochemischen Assays erklärt werden. Bekanntermaßen sind immunhistochemische Untersuchungen, die in unterschiedlichen Laboren mit unterschiedlichen Antikörpern und Protokollen durchgeführt werden, nur sehr eingeschränkt vergleichbar [33].

Die Häufigkeit einer EGFR-Genamplifikation als Ursache einer EGFR-Überexpression schwankt bei verschiedenen Tumorarten. Beim Glioblastom ist die in fast 50% der Fälle auftretende EGFR-Amplifikation praktisch die einzige Ursache für eine EGFR-Überexpression [57] und bei anderen Tumorarten kommen EGFR-Amplifikationen nur sehr selten als Ursache für eine EGFR-Expression in Frage. Die Daten unserer Untersuchung zeigen, dass EGFR-Amplifikationen beim malignen peripheren Nervenscheidentumor in signifikanter Häufigkeit vorkommen. Insgesamt 3 von 44 untersuchten Patienten mit malignen peripheren Nervenscheidentumoren wiesen eine EGFR-Amplifikation auf, wobei alle diese Tumore eine Überexpression zeigten. Unsere Daten sprechen dafür, dass die EGFR-Expression bei diesen Sarkomen homogen im ganzen Tumor ausgebildet ist. Von allen vier am Tissue Microarray identifizierten amplifizierten Präparaten wurden im Rahmen unserer Studie auch Großschnitte auf EGFR-Amplifikation untersucht, wobei sich keine Heterogenität der Amplifikation fand. Weiterhin fand sich bei dem einzigen Patienten von dem sowohl Material vom Primärtumor als auch von einem Rezidiv vorlag ein nahezu identischer Befund in beiden Präparaten.

Histologie	Autor	Anzahl (n)	Methode	Anzahl positiv in %	Mittelwert in %
maligner peripherer Nervenscheidentumor	Yang et al. 2006 [70]	1	Immunhistochemie	100	58,2
	Sato et al. 2005 [56]	18	Immunhistochemie	89	
	Gusterson et al. 1985 [26]	2	Immunhistochemie	0	
	Nielsen et al. 2003 [46]	5	Immunhistochemie	60	
	Dobashi et al. 2004 [17]	1	Immunhistochemie	0	
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100	
Synovialsarkom	Sato et al. 2005 [56]	42	Immunhistochemie	76,2	61,4
	Thomas et al. 2005 [63]	38	Immunhistochemie	55,3	
	Yang et al. 2006 [70]	3	Immunhistochemie	66,7	
	Perosio et al. 1989 [51]	4	Immunhistochemie	25	
	Dobashi et al. 2004 [17]	11	Immunhistochemie	54,5	
	Nielsen et al. 2003 [46]	46	Immunhistochemie	52	
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100	
Pleomorphes Sarkom	Yang et al. 2006 [70]	9	Immunhistochemie	77,8	57,1
	Perosio et al. 1989 [51]	9	Immunhistochemie	66,7	
	Dobashi et al. 2004 [17]	35	Immunhistochemie	14,3	
	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	0	
	Sato et al. 2005 [56]	44	Immunhistochemie	88,6	
	Gusterson et al. 1985 [26]	19	Immunhistochemie	95	
Rhabdomyosarkom	Dobashi et al. 2004 [17]	7	Immunhistochemie	28,6	64,3
	Dobashi et al. 2007 [16]	1	Immunhistochemie	0	
	Yang et al. 2006 [70]	1	Immunhistochemie	100	
Endometriales Stromasarkom des Uterus	Moinfar et al. 2005 [44]	23	Immunhistochemie	74	74
Fibrosarkom	Sato et al. 2005 [56]	11	Immunhistochemie	63,6	81,8
	Dobashi et al. 2004 [17]	2	Immunhistochemie	0	
	Gusterson et al. 1985 [26]	1	Immunhistochemie	100	
Liposarkom	Sato et al. 2005 [56]	52	Immunhistochemie	5,8	56,4
	Dobashi et al. 2004 [17]	5	Immunhistochemie	20	
	Yang et al. 2006 [70]	5	Immunhistochemie	100	
	Gusterson et al. 1985 [26]	3	Immunhistochemie	100	
Ewing Sarkom	Yang et al. 2006 [70]	7	Immunhistochemie	71,4	71,4
Chondrosarkom	Dobashi et al. 2007 [16]	2	Immunhistochemie	100	100
Dermatofibrosarkoma protuberans	Yang et al. 2006 [70]	4	Immunhistochemie	75	75

Tabelle 6 Häufige EGFR-Expression bei Sarkomen in der Literatur.

Die besondere Häufigkeit der EGFR-Amplifikation bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren ist nicht ganz unerwartet, da die Nervenscheidenzellen ebenso wie die Astrozyten von Ursprungszellen der häufig amplifizierten Glioblastome abstammen.

EGFR amplifizierte Lungenkarzinome hatten in Therapiestudien von einer Anti-EGFR-Medikation profitiert [10]. Aufgrund dieser Daten wäre es möglich, dass auch EGFR amplifizierte maligne periphere Nervenscheidentumore von derartigen Therapien profitieren könnten. Für diese Annahme würde auch die homogene Verteilung der Amplifikation in der gesamten Tumormasse sprechen. Angesichts der überdurchschnittlich schlechten Prognose dieser Tumore wären Therapieversuche mit Anti-EGFR-Medikamenten interessant.

Beim Bronchialkarzinom hatten insbesondere Patienten mit einer EGFR-Mutation von Anti-EGFR-Medikamenten profitiert [41, 49]. In einer Studie wurde gezeigt, dass EGFR-Mutationen insbesondere bei amplifizierten Tumoren vorkamen [10]. Um zu klären ob EGFR-Mutationen auch in unseren amplifizierten Tumoren vorkommen könnten, wurden die vier amplifizierten Tumore für die Exons 18 bis 21 sequenziert. Therapierelevante Mutationen fanden sich allerdings nicht.

Die einzige EGFR-Amplifikation, die sich in einem anderen Tumortyp (nicht malignen peripheren Nervenscheidentumor) fand, betraf ein Leiomyosarkom. Interessanterweise konnte bei diesem Tumor und bei einem weiteren Chromosom 7 polyploiden Leiomyosarkom keine EGFR-Expression nachgewiesen werden. Dieser Befund wäre vereinbar mit der Annahme, dass bei diesem Tumortyp ein anderes, in der Nähe von EGFR (7p12) liegendes Gen, die Amplifikation darstellt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen dafür, bei Tumoren, bei denen die Diagnose eines malignen peripheren Nervenscheidentumors erwogen wird, auch eine EGFR-Amplifikationsanalyse durchzuführen. Das Vorliegen einer Amplifikation würde offensichtlich die Diagnose eines malignen peripheren Nervenscheidentumors unterstützen. Gleichzeitig könnte sie Anhaltspunkte auf eine weitere, bei diesen Tumoren bisher nicht bekannte, Therapieoption ergeben. Klinische Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von Anti-EGFR-Medikamenten bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren sind dringend indiziert.

6 Zusammenfassung

Tyrosinkinase sind die heute am besten etablierten spezifischen Therapiezielproteine bei malignen Tumoren. Die derzeit wirksamsten tyrosinrezeptorspezifischen Krebsmedikamente sind Iressa® (Zielgen: EGFR), Herceptin® (Zielgen: HER2) oder Glivec® (Zielgen: KIT / PDGFR).

Anti-EGFR-Medikamente scheinen insbesondere bei Tumoren mit DNA-Veränderungen des EGFR-Gens (Amplifikation / Mutation) wirksam zu sein.

Über die Häufigkeit einer EGFR (HER1) Amplifikation und Mutation in menschlichen Weichteiltumoren ist bisher wenig bekannt.

Um EGFR-Veränderungen bei Sarkomen zu untersuchen wurde zunächst ein 504 Weichteiltumore umfassender Sarkom Tissue Microarray angefertigt. An diesen Tumoren wurde die EGFR-Amplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und die EGFR-Expression mittels Immunhistochemie ermittelt. Anschließend wurden die amplifizierten Tumore einer Exon 18-21 Mutationsanalyse unterzogen.

Amplifikationen des EGF-Rezeptors erwiesen sich in Weichteilsarkomen als sehr selten. In der Gruppe der malignen peripheren Nervenscheidentumore (n=44) konnten vier Amplifikationen bei drei Patienten nachgewiesen werden. Alle amplifizierten Tumore zeigten eine starke EGFR-Expression. Die Häufigkeit der EGFR-Amplifikation war nicht ganz unerwartet, da die Nervenscheidenzellen ebenso wie die Astrozyten von Ursprungszellen der häufig amplifizierten Glioblastome abstammen.

In der Gruppe der Leiomyosarkome konnte eine Amplifikation gefunden werden, wobei der Tumor keine EGFR-Expression aufwies. Die restlichen untersuchten Sarkome zeigten keine Amplifikation.

Die mittels PCR durchgeführten Mutationsanalysen der amplifizierten Tumore konnte keine Exon 18-21 Mutation zeigen. Acht Tumore des Kollektivs zeigten eine Polyploidie (zwei Lipo- und Leiomyosarkome und je ein Granularzelltumor, maligner peripherer Nervenscheidentumor, Gastrointestinaler Stromatumor und Angiosarkom), die aber nur beim malignen peripheren Nervenscheidentumor eine starke EGFR-Expression zeigte. Unsere Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass bei Tumoren, bei denen die Diagnose eines malignen peripheren Nervenscheidentumors erhoben wird, auch eine EGFR-

Amplifikationsanalyse durchzuführen. Das Folgen einer Amplifikation würde offensichtlich die Diagnose eines malignen peripheren Nervenscheidentumors unterstützen. Gleichzeitig könnte sie Anhaltspunkte auf eine weitere, bei diesen Tumoren bisher nicht bekannte, Therapieoption ergeben. Klinische Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von Anti-EGFR-Medikamenten bei malignen peripheren Nervenscheidentumoren sind dringend indiziert.

7 Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonuclein acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Human Epidermal Growth Receptor
IHC	Immunhistochemie
MFH	Malignes Fibröses Histiocytom
MPNST	Maligner Peripherer Nervenscheidentumor
PCR	Polymerase-chain-reaction
PNET	Primitiver Neuroektodermaler Tumor
TMA	Tissue Microarray

8 Literaturverzeichnis

1. Alvergard T (1996) Soft tissue sarcomas. *Acta Oncol.* 7: 117 - 122
2. Amare PS, Varghese C, Bharde SH, Narasimhamoorthy NK, Desai S, Advani SH, Havaladar R, Kulkarni JN (2001) Proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor (EGFR) status in renal cell carcinoma patients with polysomy of chromosome 7. *Cancer Genet Cytogenet.* 125: 139 - 146
3. Azemar M, Schmidt M, Arlt F, Kennel P, Brandt B, Papadimitriou A, Groner B, Wels W (2000) Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int J Cancer.* 86: 269 - 275
4. Baekelandt M, Kristensen GB, Trope CG, Nesland JM, Holm R (1999) Epidermal growth factor receptor expression has no independent prognostic significance in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res.* 19: 4469 - 4474
5. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, Glatfelter AA, Duray PH, Meltzer PS (2005) Gene Expression Profiling of Human Sarcomas: Insights into Sarcoma Biology. *Cancer Research* 65: 9226 - 9235
6. Bergstrom JD, Westermark B, Heldin NE (2000) Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 259: 293 - 299
7. Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, Zschesche W, Binas B, Juergensen C, Theuring F (2000) Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene.* 19: 2129 – 2137
8. Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, Abbruzzese J, Traxler P, Buchdunger E, Radinsky R, Fidler IJ (2000) Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase

inhibitor leads to apoptosis of 31 endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 60: 2926 - 2935

9. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, Lelle R, Boecker W, Brandt B (2000) Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of EGFR is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res.* 60: 854 - 857

10. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 4: 643 - 655

11. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, Domenichi I, Bartolini S, Ceresoli GL, Rossi E, Ludovini V, Toschi L, Franklin WA, Carino L, Gazar AF, Bunn PA JR, Hirsch FR (2005) Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positiv non-small-cell lung cancer patients. *J Clin. Oncol.* 22: 5007 - 5018

12. Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S (2004) Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol.* 200: 343 - 350

13. De Luca A, Pignata S, Casamassimi A, D'Antonio A, Gridelli C, Rossi A., Cremona F, Parisi V, De Matteis A, Normanno N (2000) Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription – PCR assay. *Clin Cancer Res.* 6: 1439 - 1444

14. Dietzmann K, von Bossanyi P (1994) Coexpression of epidermal growth factor receptor protein and c-erbB-2 oncoprotein in human astrocytic tumors. An immunohistochemical study. *Zentralbl Pathol.* 140: 335 - 341

-
15. Dirix LY, Somville J, Van Oosterom AT (1996) Diagnosis and treatment of soft tissue sarcomas in adults. *Curr. Opinion Oncol.* 8: 289 - 298
 16. Dobashi Y, Suzuki S, Sugawara H, Ooi A (2007) Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors. *Hum Pathol.* 38: 914 - 925
 17. Dobashi Y, Takei N, Suzuki S, Yoneyama H, Hanawa M, Ooi A (2004) Aberration of epidermal growth factor receptor expression in bone and soft-tissue tumors: protein overexpression, gene amplification and activation of downstream molecules. *Mod Pathol.* 17: 1497 - 1505
 18. Doroshow JH (2005) Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353: 200 - 202
 19. Enzinger FM, Weiss SW (1995) *Soft tissue tumor*, mosby Verlag, St. Louis 3. Auflage
 20. Fan Z, Mendelsohn J (1998) Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr Opin Oncol.* 10: 67 - 73
 21. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A (1999) Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery* 45: 1442 - 1453
 22. Friderici von E (2008), Häufigkeiten sowie prognostische Bedeutung von BCL2 Amplifikationen und p53 Alterationen bei menschlichen Sarkomen, den Rezidiven und Metastasen. *Med. Dissertation Universität Hamburg (noch nicht abgeschlossen)*
 23. Fry DW, Nelson JM, Slintak V, Keller PR, Rewcastle GW, Denny WA, Zhou H, Bridges AJ (1997) Biochemical and antiproliferative properties of 4-[ar(alk)ylamino]pyridopyrimidines, a new chemical class of potent and specific

epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 54: 877 – 887

24. Gale N, Kambic V, Poljak M, Cor A, Velkavrh D, Mlacak B (2000) Chromosomes 7,17 polysomies and overexpression of epidermal growth factor receptor and p53 protein in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Oncology.* 58: 117 - 125

25. Gerosa MA, Talarico D, Fognani C, Raimondi E, Colombatti M, Tridente G, De Carli L, Della Valle G (1989) Overexpression of N-ras oncogene and epidermal growth factor receptor gene in human glioblastomas. *J Natl Cancer Inst.* 81: 63 - 67

26. Gusterson B, Cowley G, McIlhinney J, Ozanne B, Fisher C, Reeves B (1985) Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *Int J Cancer.* 15: 689 - 693

27. Herynk M H, Radinsky R (2000) The coordinated functional expression of epidermal growth factor receptor and c-Met in colorectal carcinoma metastasis. *In Vivo.* 14: 587 - 596

28. Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res.* 60: 6868 - 6874

29. Hurks HM, Metzelaar-Blok JA, Barthen ER, Zwinderman AH, De Wolff-Rouendaal D, Keunen JE, Jager MJ(2000) Expression of epidermal growth factor receptor: risk factor in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 2023 - 2027

30. Iihara K, Shiozaki H, Tahara H, Kobayashi K, Inoue M, Tamura S, Miyata M, Oka H, Doki Y, Mori T (1993) Prognostic significance of transforming growth factor alpha in human esophageal carcinoma. Implication for the autocrine proliferation. *Cancer* 71 : 2902 - 2909

-
31. Ilekis JV, Connor JP, Prins GS, Ferrer K, Niederberger C, Scoccia B (1997) Expression of epidermal growth factor and androgen receptors in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 66: 250 - 254
32. Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Higashiyama S, Monden M, Matsuura N (2001) Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Pathol Res Pract.* 197: 95 - 100
33. Kersting C, Packeisen J, Leidinger B, Brandt B, von Wasielewski R, Winkelmann W, van Diest PJ, Gosheger G, Buerger H (2006) Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR - expression in soft tissue sarcoma. *J Clin Pathol.* 59: 585 - 590
34. Kordek R, Biernat W, Alwasiak J, Maculewicz R, Yanagihara R, Liberski PP (1995) p53 protein and epidermal growth factor receptor expression in human astrocytomas. *J Neurooncol.* 26: 11 - 16
35. Krahn G, Leiter U, Kaskel P, Udart M, Utikal J, Bezold G, Peter RU (2001) Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer. *Eur J Cancer.* 37: 251 - 259
36. Krawczyk P, Chocholska S, Milanowski J (2003) Anti-HER therapeutic agents in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska.* 58: 113 -117
37. Kumar VL, Majumder PK, Kumar V (2000) Observations on EGFR gene amplification and polymorphism in prostatic diseases. *Int Urol Nephrol.* 32: 73 - 75
38. L`Allemain G (2003): HER - ErbB family of receptors and their ligands: mechanisms of activation, signals and deregulation in cancer. *Bull Cancer.* 90: 179 - 185

-
39. Löffler G (1999) *Gentechnik, Basiswissen Biochemie*, Springer–Verlag Berlin 3. Auflage: 361 – 364
40. Lydon NB, Mett H, Mueller M, Becker M, Cozens RM, Stover D, Daniels D, Traxler P, Buchdunger E (1998) A potent protein-tyrosine kinase inhibitor which selectively blocks proliferation of epidermal growth factor receptor-expressing tumor cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 76: 154 - 163
41. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129 - 2139
42. Mirlacher M, Storz M (2000) Gewebe-Chips für die molekulare Untersuchung von Tumoren. *Histo Journal* 19: 7 - 17
43. Miturski R, Semczuk A, Postawski K, Jakowicki J.A (2000) Epidermal growth factor receptor immunostaining and epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase activity in proliferative and neoplastic human endometrium. *Tumour Biol*. 21: 358 - 366
44. Moinfar F, Gogg-Kammer M, Sommersacher A, Regitnig P, Man YG, Zatloukal K, Denk H, Tavassoli FA (2005) Endometrial stromal sarcomas frequently express epidermal growth factor receptor (EGFR, HER - 1): potential basis for a new therapeutic approach. *Am J Surg Pathol*. 29: 485 - 489
45. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A, DiOrio C, Doty J, Morin MJ, Moyer MP, Neveu M, Pollack VA, Pustilnik LR, Reynolds MM, Sloan D, Theleman A, Miller P (1997) Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res*. 57: 4838 - 4848

-
46. Nielsen TO, Hsu FD, O'Connell JX, Gilks CB, Sorensen PH, Linn S, West RB, Liu CL, Botstein D, Brown PO, van de Rijn M (2003) Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *Am J Pathol.*163: 1449 - 1456
47. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue Microarrays(TMAs) for High-Throughput molecular Pathology Research. *Int. J. Cancer.* 94: 1 - 5
48. Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Ishida S, Nagase A, Miyokawa N, Hirata S, Kikuchi K (2000) Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol Rep.* 7: 603 - 607
49. Paez JG, Janne PA, Lee JC (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497 – 1500
50. Pao W, Miller V, Zakowski M (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13306 – 13311
51. Perosio PM, Brooks JJ (1989) Expression of growth factor receptors in soft tissue tumors. Implications for the autocrine hypothesis. *Lab Invest.* 60: 245 – 253
52. Rainov NG, Dobberstein KU, Bahn H, Holzhausen HJ, Lautenschlager C, Heidecke V, Burkert W (1997) Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. *J Neurooncol.* 35: 13 - 28
53. Rubin I, Yarden Y (2001) The basic biology of HER2. *Annals of Oncology* 12: 3 – 8

-
54. Rydholm A (1997) Prognostic factors in soft tissue sarcoma. *Acta Orthop. Scand.* 68: 148 - 155
55. Sanz - Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, Sanz - Esponera J, Merino MJ (2000) Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol.* 15: 455 - 462
56. Sato O, Wada T, Kawai A, Yamaguchi U, Makimoto A, Kokai Y, Yamashita T, Chuman H, Beppu Y, Tani Y, Hasegawa T (2005) Expression of epidermal growth factor receptor, ERBB2 and KIT in adult soft tissue sarcomas: a clinicopathologic study of 281 cases. *Cancer.* 1: 1881 - 1890
57. Schlegel J, Stumm G, Brandle K, Merdes A, Mechttersheimer G, Hynes NE, Kiessling M (1994) Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol.* 22: 201 - 207
58. Sheinin Y, Kaserer K, Wrba F, Wenzl E, Kriwanek S, Peterlik M, Cross HS (2000) In situ mRNA hybridization analysis and immunolocalization of the vitamin D receptor in normal and carcinomatous human colonic mucosa: relation to epidermal growth factor receptor expression. *Virchows Arch.* 437: 501 - 507
59. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 353: 123 -132
60. Simon R, Mirlacher M, Sauter G (2005) Tissue microarrays *Methods. Mol Med.* 114: 257 - 268

-
61. Soares R, Pereira MB, Silva C, Amendoeira I, Wagner R, Ferro J, Schmitt FC (2000) Expression of TGF- α and EGFR in Breast Cancer and its Relation to Angiogenesis. *Breast J.* 6: 171 - 177
62. Thogersen V.B, Jorgensen PE, Sorensen BS, Bross P, Orntoft T, Wolf H, Nexø E (1999) Expression of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor in human bladder cancer. *Scand J Clin Lab Invest.* 59: 267 - 277
63. Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, Biermann S, Sondak VK, Trent JC., Yu D, Pollock RE, Baker L (2005) Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER – 2 / neu in synovial sarcoma. *Cancer.*15: 830 - 838
64. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel - Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA (2005) Erlotinib in lung cancer – Molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 353: 133 – 144
65. Uckun FM, Narla RK, Zeren T, Yanishevski Y, Myers DE, Waurzyniak B, Ek O, Schneider E, Messinger Y, Chelstrom LM, Gunther R, Evans W (1998) In vivo toxicity, pharmacokinetics, and anticancer activity of Genistein linked to recombinant human epidermal growth factor. *Clin Cancer Res.* 4: 1125 - 1134
66. Weiss SW (1994) *Histological typing of soft tissue tumors*, 2 Auflage. Springer, Berlin Heidelberg
67. Willeke F, Lehnert T (2003) *Weichteilsarkome im Erwachsenenalter*, Schriftreihe des Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim. 5. Auflage: 8 - 9
68. Woodburn JR (1999) The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 82: 241 - 250

-
69. Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CH, Neal DE (1991) Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer.* 63: 967 - 990
70. Yang JL, Hannan MT, Russell PJ, Crowe PJ (2006) Expression of HER1/EGFR protein in human soft tissue sarcoma. *Eur J Surg Oncol* 32: 466 - 468
71. Yang X, Jia X, Corvalan JR, Wang P, Davis CG (2001) Development of ABX - EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 38: 17 - 23
72. Zahm SH, Fraumeni JF Jr (1997) The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin Oncol.* 24: 504 - 514
73. Zhao J, Liang SX, Savas L, Banner BF (2001) An immunostaining panel for diagnosis of malignancy in mucinous tumors of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 125: 765 – 769

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

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

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

Unterschrift:

11 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Meinem Doktorvater und Direktor des Instituts für Pathologie, Herrn **Professor Dr. med. G. Sauter**, gilt für die Überlassung des interessanten Themas und die kooperative Zusammenarbeit mein besonderer Dank.

Herrn **Dr. med A. Quaas** danke ich für die exzellente und vertrauensvolle Betreuung, seinen unermüdlichen Einsatz auch am Wochenende, sein stetiges Interesse an dieser Arbeit und die vielen Diskussionen und Anregungen.

Herrn **Dr. med W. Wilczak** danke ich für das großzügige Einbringen seiner wissenschaftlichen Erfahrung auf dem Gebiet der Weichteilsarkome.

Frau **Mirlacher** und **allen Laborantinnen** des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Diagnostik und Erstellen des Arrays sowie Herrn **PD Dr. R. Simon** und dem gesamten Team der Molekularpathologie.

Bei **allen Kellerkindern** der Pathologie aber ganz besonders, bei meinen Kommilitonen **Elisa** für die grandiose Zusammenarbeit beim Erstellen des Arrays und natürlich bei **Tina** für die großartige Hilfe bei der Auswertung der FISH - Technik.

Meinem Freund **Jan-Willem** für die Vermittlung seiner Computerkenntnisse auch weit nach Mitternacht.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, **Ute Martens - Hochreiter** und **Friedrich Martens** für die einzigartige Unterstützung bedanken, mit der sie mir das Studium und damit die Dissertation erst ermöglichten.