

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

**Prognostische und prädiktive Bedeutung von HER-2/*neu* im Serum  
bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom  
unter palliativer Chemotherapie  
(Epirubicin/Paclitaxel versus Epirubicin/Cyclophosphamid)**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin

dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Isabell Diana Witzel  
geboren in Rotthalmünster

Hamburg 2001



**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1. Einführung: Das Mammakarzinom .....	1
1.2. HER-2/ <i>neu</i> .....	3
1.3. Prognostische und prädiktive Bedeutung von HER-2/ <i>neu</i> .....	5
1.4. Nachweismethoden von HER-2/ <i>neu</i> .....	10
1.5. HER-2/ <i>neu</i> -Bestimmung im Serum .....	12
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit .....	13
2. Material und Methoden .....	15
2.1. Material .....	15
2.1.1. Normalkollektiv .....	15
2.1.2. Patientinnen aus der AGO-Studie .....	15
2.1.2. Tumormarker CA 15-3 .....	18
2.1.3. Paraffinschnitte des Primärtumors .....	18
2.2. Methoden .....	18
2.2.1. ELISA .....	18
2.2.2. CA 15-3-Bestimmung .....	22
2.2.3. Immunhistochemie .....	23
2.3. Statistische Auswertung .....	24
3. Ergebnisse .....	26
3.1. Datenüberblick .....	26
3.2. HER-2/ <i>neu</i> -Konzentrationen .....	28
3.3. Verteilung von HER-2/ <i>neu</i> innerhalb verschiedener Prognoseparameter .....	30
3.4. Korrelation der HER-2/ <i>neu</i> -Befunde im Serum mit der HER-2/ <i>neu</i> -Überexpression des Primärtumors .....	31
3.5. Bestes Ansprechen unter der Therapie .....	32
3.6. Progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben .....	38
3.6.1. insgesamt .....	38
3.6.2. in Abhängigkeit von der Therapie .....	38
3.6.3. in Abhängigkeit von HER-2/ <i>neu</i> vor der Therapie .....	39
3.6.4. in Abhängigkeit von anderen Prognoseparametern .....	42

3.6.5. in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisierung ..... 42

3.7. HER-2/ <i>neu</i> und Metastasierung.....	43
3.8. Korrelation von HER-2/ <i>neu</i> -Verlaufskontrollen mit dem Tumormarker CA 15-3 .....	45
4. Diskussion .....	52
4.1. Wahl des Grenzwertes .....	52
4.2. Vergleich zwischen Immunhistochemie und ELISA .....	53
4.3. Prognostischer Wert von <i>HER-2/neu</i> .....	55
4.4. Prädiktiver Wert von <i>HER-2/neu</i> .....	57
4.5. Bedeutung von HER-2/ <i>neu</i> als Tumormarker .....	58
5. Zusammenfassung .....	60
6. Abkürzungen .....	62
7. Literaturverzeichnis .....	63
8. Anhang .....	77
Informationsblatt und Einwilligungserklärung.....	77
9. Danksagungen .....	79
10. Lebenslauf .....	80
11. Erklärung .....	81

### 1. Einleitung

#### 1.1. Einführung: Das Mammakarzinom

In Deutschland erkranken jährlich nahezu 46.000 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 17.000 im Alter unter 60 Jahren. Brustkrebs stellt damit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und ist für 26% aller Krebsneuerkrankungen und 18% aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63,5 Jahren [1].

Es wird heute davon ausgegangen, daß vor allem reproduktive, hormonelle und genetische Faktoren mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert sind: Brustkrebs in der Familie (Mutter, Schwester), gutartige Brusterkrankungen in der Anamnese, reproduktive Faktoren (höheres Alter bei erster Geburt, Kinderlosigkeit, frühe Menarche und/oder späte Menopause), sowie ionisierende Strahlung. In verschiedenen Studien wurden darüber hinaus Zusammenhänge mit den Ernährungsgewohnheiten (insbesondere einer hyperkalorischen Ernährung) sowie mit dem Alkoholkonsum beobachtet. Die Befürchtung, daß die Einnahme oraler Kontrazeptiva zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos führt, hat sich offenbar nicht bestätigt [1].

Trends: Die Brustkrebsinzidenz zeigt in Deutschland wie in allen anderen Ländern der EU in den letzten 20 Jahren einen steigenden Trend.

Überlebensrate: Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt heute etwa 73%. Einer an Brustkrebs erkrankten Frau gehen durchschnittlich 6 Jahre ihrer ausstehenden Lebenserwartung verloren [1].

Ziel klinischer Studien ist es vorrangig, die Mortalitätsrate zu senken. Können durch Primärtherapie wie Operation, Bestrahlung und Folgebehandlungen etwa 30 % der Patientinnen dauerhaft geheilt werden, so treten bei 70% dennoch ein Lokalrezidiv oder eine distante Metastasierung auf.

Die Prognose der Patientinnen mit primärer Erkrankung wird durch klinische, histopathologische und biochemische Faktoren bestimmt.

Zu den klinischen Daten zählen das Alter der Patientin bzw. der prä- oder postmenopausale Hormonstatus.

Die Tumorausbreitung wird durch das TNM-System bestimmt, entsprechend der Richtlinien der UICC (Union Internationale Contre Le Cancer). Anhand des postoperativ durch

histopathologische Untersuchung gesicherten pTNM-Schemas lassen sich Größe des Primärtumors (pT), Befall der regionären Lymphknoten (pN) und Fernmetastasierung (pM) einstufen [2].

Der Befall der Lymphknoten wird in vielen Untersuchungen als der bedeutendste prognostische Marker angesehen. 70 % der nodalpositiven Patientinnen entwickeln in den ersten zehn Jahren ein Rezidiv, dagegen nur 30 % der nodalnegativen.

Als ergänzende prognostische und prädiktive Faktoren müssen am Tumorgewebe neben Tumorgröße und Lymphknotenstatus bestimmt werden:

- der histologische Typ:

Das invasiv-duktales Karzinom bildet die größte Gruppe, gefolgt vom invasiv-lobulären und medullären Karzinom.

- der Differenzierungsgrad (Grading):

Das Tumor-Grading nach Bloom and Richardson erfaßt unabhängig vom Geschwulsttyp histologische und zytologische Merkmale und ordnet diese in ein Schema von üblicherweise drei Differenzierungsgraden (Grading I-III). Diese Einteilung beruht auf drei Kriterien: dem Grad der tubulären Differenzierung, der Polymorphie und dem Anteil an Mitosen [3].

- der Östrogen- und der Progesteronrezeptorstatus:

Der Nachweis von Steroidhormonrezeptoren wird von einigen Autoren mit einer günstigen Prognose in Zusammenhang gebracht. Diese Rezeptoren sind vor allem aber ein prädiktiver Parameter für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie.

Das Mammakarzinom metastasiert häufig und früh.

Der Verlauf der Erkrankung wird ausschließlich davon bestimmt, ob eine Fernmetastasierung eintritt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fernmetastasen kann durch eine adjuvante, postoperative, systemische Therapie und der Tod am Mammakarzinom um etwa 20% gesenkt werden [4]. Für Patientinnen mit Metastasen ist eine Heilung nicht möglich. Man muß daher durch die Behandlung der Metastasierung den Erhalt der Lebensqualität anstreben (Palliation). Man hat in den letzten Jahren intensiv untersucht, ob sich durch eine aggressivere Chemotherapie mit Anthrazyklinen und neueren Substanzen, wie z.B. Taxanen, oder durch Dosiserhöhung, eine Verlängerung des Überlebens erreichen läßt [4].

Die etablierten Prognoseparameter allein reichen noch nicht aus, um allen Patientinnen zum Zeitpunkt der Metastasierung ein möglichst spezifisches Therapieschema zukommen zu lassen. Es gilt, etwaige neue Prognoseindikatoren, wie z.B. HER-2/*neu*, die zusätzliche Informationen über Aggressivität, Proliferationsverhalten und Therapieansprechen machen könnten, intensiv zu untersuchen.

### 1.2. HER-2/*neu*

Das HER-2/*neu*-Protein (c-erbB-2) gehört zu einer Familie von 4 Wachstumsfaktorrezeptoren, darunter der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER-1 (erbB-1, EGF-R), sowie HER-3 und HER-4 [5]. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert [6]. Es wurde zuerst beim chemisch induzierten Neuroblastom der Ratte durch Ethylnitrosoharnstoff beschrieben [7].

Aufgrund der Ähnlichkeiten mit dem Genom des Retrovirus „v-erbB“ und mit dem Genom des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors „c-erbB-1“ wurde es „c-erbB-2“ benannt. Mitte der 80er Jahre entdeckten Wissenschaftler das Äquivalent beim Menschen, welches den Namen „HER-2/*neu*“ erhielt (= **H**uman **E**pidermal Growth Factor **R**eceptor).

Immunhistochemische Studien zeigten nachfolgend, daß das HER-2/*neu*-Protein in 30-50% der Tumoren epithelialen Ursprungs vermehrt ist [8]. Normale Epithelzellen besitzen ungefähr 100.000 HER-2/*neu*-Moleküle pro Zelle, wohingegen Tumorzellen beim Menschen 30-45fach erhöhte Werte zeigen [9].

Das humane HER-2/*neu* kodiert ein 185 kDa schweres transmembranäres Glykoprotein. Es besteht aus einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität, einer transmembranären und einer extrazellulären Domäne, welche als Ligandenbindungsregion fungiert. Am C-terminalen Ende des Moleküls befindet sich eine Region bestehend aus 580 Aminosäuren, die für die zytoplasmatische Aktivität der Tyrosinkinase verantwortlich ist. Dieser Teil des *neu*-Gens stimmt zu 88% mit dem betreffenden Teil des EGFR-Gens (= HER-1 = erbB-1) überein und ist ebenfalls eng mit anderen bekannten Tyrosinkinasegenen verwandt. Der extrazelluläre Teil des Moleküls ist stark glykosiliert und bildet die Ligandenbindungsregion. Dieser Teil des *neu*-Gens stimmt zu 44% mit dem betreffenden Teils des EGFR-Gens überein. Die extrazelluläre Domäne (ECD) und die intrazelluläre Tyrosinkinase-region sind über die hydrophobe transmembranäre Domäne verbunden [10].

Die Regulierung des Proto-Onkogens geschieht durch Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts [11]. Jedoch sind der genaue biologische Mechanismus der Onkogenaktivierung, der dazugehörige Signaltransduktionsweg und der Einfluß auf den Zellzyklus bis jetzt noch nicht ausreichend aufgeklärt.

Man geht heute davon aus, daß HER-2/*neu* der bevorzugte Partner bei der Heterodimerisation von Rezeptoren innerhalb der HER-Familie ist. Die Heterodimerisation erfolgt durch sogenannte „EGF-ähnliche Liganden“, die am N-terminalen hochaffinen Ende spezifisch an einen Rezeptor binden und am C-terminalen niederaffinen Ende die Bindung eines zweiten Rezeptors erleichtern [12]. HER-2/*neu* stabilisiert dabei die Rezeptor-Liganden-Interaktion und verhindert die Abspaltung der Liganden. HER-2/*neu* enthaltende Heterodimere zeigen erhöhte Ligandenbindungsaffinität und erhöhte Signaltransduktionsaktivität [13] und verminderte Endozytose [14]. Die beim Mammakarzinom bevorzugte Heterodimerisation erfolgt zwischen HER2 und HER3. Nach der Heterodimerisation kommt es zur Aktivierung von zytoplasmatischen Signalproteinen, die intrazelluläre Signaltransduktionswege fördern und schließlich die Transkription von Onkogenen (c-fos, c-myc,...) initiieren [15]. HER-2/*neu* soll eine zentrale Rolle in der Migration und Invasion der Tumorzellen spielen [16; 17; 18] und die Apoptose der Zelle verhindern [19].

Die extrazelluläre Domäne (ECD) des HER-2/*neu*-Proteins wird von der Zelloberfläche freigesetzt („shed antigen“) und ins Serum abgegeben [20]. Die Abspaltung erfolgt durch einen bis jetzt noch nicht identifizierten Mechanismus [21; 22]. Sie hat ein Molekulargewicht von ungefähr 105 kDa (mit einer Spannweite von 97 bis 115 kDa), welches im Serum, Plasma oder in Gewebeproben von Patienten mit Tumoren epithelialen Ursprungs quantifiziert werden kann [23]. In p185-überexprimierenden Zellkulturen zeigte sich, daß der Verlust der extrazellulären Domäne des Proto-Onkogens die Rezeptor-Liganden-Interaktion unterbricht und die Differenzierung der proliferierenden Zellen einleitet [24; 25].

### 1.3. Prognostische und prädiktive Bedeutung von HER-2/*neu*

#### HER-2/*neu* in der Schwangerschaft:

Es finden sich erhöhte HER-2/*neu*-Spiegel im Blut im 3. Trimenon der Schwangerschaft. Die Überexpression des Onkogens ist in Plazenta und epithelialen Zellen des Feten nachzuweisen. Die Werte variieren bei plazentarer oder fetaler Fehlentwicklung [26]. Interessant ist die umgekehrte Proportionalität zwischen Östrogenspiegel und p185-Expression der Plazenta, was darauf hindeuten könnte, daß Östrogene die Expression des Proto-Onkogens herunterregulieren (down-regulation) [27].

#### HER-2/*neu* und Tumoren epithelialen Ursprungs:

Epitheliale Zellen der meisten Organe exprimieren HER-2/*neu*. In einigen Karzinomtypen ist die normale Expression, oftmals aufgrund von Genamplifikation, gesteigert. Zum Beispiel zeigen 14-32 % der Ovarialkarzinome eine Überexpression, und das Überleben der Patientinnen mit HER-2/*neu*-Überexpression ist signifikant kürzer als das von Nicht-Erhöhten [28-30].

Ein anderes Beispiel ist das Pankreaskarzinom. 30-35 % der Adenokarzinome zeigen eine Überexpression, die ebenfalls mit einem verkürztem Überleben korreliert ist [31].

Andere Karzinome, die unterschiedlich erhöhte HER-2/*neu*-Werte aufweisen, sind solche des Magens, der Lunge, des Kolons, der Niere, der Blase, der Prostata und ebenso der Speicheldrüsen [32]. Aber die prognostische Signifikanz ist meist noch nicht so ausführlich untersucht wie die bei Brust- und Ovarialkarzinom.

#### HER-2/*neu* und Brustkrebs- prognostische Bedeutung:

Im Gegensatz zu benignen Brusterkrankungen, die keine erhöhte HER-2/*neu*-Expression zeigen, konnten in 40-60% der duktaalen Carcinome *in situ* (DCIS) erhöhte Werte nachgewiesen werden [33].

25-30% der Mammakarzinome überexprimieren das HER-2/*neu*-Protein [34].

Eine frühe Arbeit, die sich mit der prognostischen Bedeutung von HER-2/*neu* beschäftigte, fand, daß die Überexpression signifikant mit einer schlechteren Prognose, verkürztem Überleben und verkürztem rezidivfreien Intervall korreliert [34]. HER-2/*neu* sollte nach dem

Lymphknotenbefall der stärkste unabhängige Prognosefaktor für den Verlauf der Brustkrebserkrankung sein [35].

In einer Meta-Analyse zu diesem Thema sind 97 verschiedenen Studien mit insgesamt 22616 Patientinnen verglichen worden [36].

Obwohl die in der Meta-Analyse berücksichtigten Studien in ihren Aussagen oftmals differieren, lassen sich Zusammenhänge zwischen dem Her-2/*neu*-positiven Tumor und einigen klinisch-pathologischen Parametern beobachten. So weist der Her-2/*neu*-überexprimierende Tumor oftmals keine Steroidrezeptoren auf (Östrogen- und Progesteronrezeptoren). Der Mechanismus, wie sich der HER-2/*neu*-Rezeptor und der Östrogenrezeptor gegenseitig beeinflussen, ist noch nicht geklärt [37; 38]. Außerdem korreliert ein hoher HER-2/*neu*-Wert eher mit bestimmten histologischen Gruppen des Mammakarzinoms (nämlich duktal invasives und *in situ* Karzinom), schlechterem histologischem Grading, Aneuploidie und hoher Proliferationsrate der Tumorzelle [39]. In der univariaten Analyse korreliert HER-2/*neu* signifikant mit einer schlechteren Prognose. Es ist wahrscheinlich, daß HER-2/*neu* ein Marker ist, der die Aggressivität des Tumors beschreiben kann. Trotzdem kann er bis jetzt in multivariater Analyse nicht eindeutig mit der klinischen Prognose korreliert werden [36].

Etlche weitere Untersuchungen ergeben unterschiedliche Ergebnisse für die prognostische Bedeutung des Proto-Onkogens HER-2/*neu*. Kandl et al. konnten bei fortgeschrittener Brustkrebserkrankung für lösliche Fragmente des Onkogens im Serum eine deutliche Beziehung zwischen medianem Überleben und Höhe des Onkogens herstellen [40]. Isola et al. zeigten, daß erhöhte Werte im Serum präoperativ vor allem bei solchen Patientinnen gemessen werden konnten, die einen großen Primärtumor, Lymphknotenbefall in der Axilla oder eine Metastasierung aufwiesen. Erhöhte Werte konnten außerdem das Auftreten von Metastasen innerhalb der nächsten 6 Monate bei 37% der Patientinnen vorhersagen [41]. In weiteren Studien wird bestätigt, daß Serumwerte -gemessen bei Rezidiven- bei systemischer Metastasierung öfter erhöht sind als bei einem lokoregionären Rezidiv (68 zu 19%) [11]. In einer 412 Patientinnen umfassenden Studie von Molina et al. konnte gezeigt werden, daß bei Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium der Brustkrebserkrankung eher höhere Werte nachweisbar sind als bei Patientinnen mit lokoregionär beschränkter Erkrankung (45,4 zu 9,2%). War der Primärtumor Östrogen(ER)- oder Progesteronrezeptor(PR)-negativ, war HER-2/*neu* deutlicher erhöht als bei ER- oder PR-positiven Tumoren. Wird der prognostische Wert

des Onkogens betrachtet, verschlechtert ein erhöhter Wert deutlich die Prognose bei nodalpositiven und –negativen Patientinnen [42].

Die prognostische Signifikanz des HER-2/*neu*-Proteins im Serum bei metastasiertem Mammakarzinom wurde z.B. von Fehm et al. untersucht. In einer multivariaten Analyse war HER-2/*neu* im Serum der größte Prognosefaktor für das Überleben nach Rezidivauftreten, wohingegen der HER-2/*neu*-Spiegel zum Zeitpunkt der Primärtumorentfernung keinerlei Einfluß auf das Überleben bei Metastasierung aufzeigen konnte [6].

### Prädiktive Bedeutung von HER-2/*neu*

Im Vergleich zu den Studien über die prognostische Bedeutung von HER-2/*neu* sind Studien über das Therapieansprechen etwas weniger zahlreich.

Erhöhte HER-2/*neu*-Werte korrelieren signifikant mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Hormontherapie [43-45]. An Östrogenrezeptor-positiven MCF-7 Brustkrebszellen bewirkt HER-2/*neu* eine vermehrte Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>1</sub>, was zum besseren Überleben der HER-2/*neu* überexprimierenden Zelle führt. Dadurch vermindert sich die Tamoxifen-induzierte Apoptose [46].

Die ersten Studien, die sich mit dem Ansprechen auf die adjuvante Chemotherapie befaßten, kamen zu dem Schluß, daß erhöhte HER-2/*neu*-Werte zu einem schlechteren Ansprechen bei Chemotherapien führen, die CMF enthalten (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil) [8; 47]. Allerdings beschreiben aktuellere Arbeiten keinen Unterschied im Ansprechen auf die CMF-Therapie in Abhängigkeit von HER-2/*neu* [48] bzw. sogar ein verbessertes Ansprechen der HER-2/*neu*-positiven Tumoren auf CMF [49]. Weitere Studien konnten zeigen, daß hohe HER-2/*neu*-Werte mit besserem Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapien verbunden sind [50].

Das Ergebnis eines an MCF-7 Brustkrebszellen durchgeführten Experiments ergab, daß die Aktivierung von HER-2/*neu* eine Amplifikation des Topoisomerase II $\alpha$ -Gens bewirkt. Da Anthrazykline an der Topoisomerase II $\alpha$  angreifen, könnte also die HER-2/*neu*-Aktivierung indirekt zum gesteigerten Wirkpotential der Chemotherapeutika beitragen [51]. Eine Untersuchung von 136 primären Mammakarzinomen mittels FISH konnte zeigen, daß die HER-2/*neu*-Überexpression zu einer Amplifikation oder Deletion des Topoisomerase II $\alpha$ -Gens führt [52].

Nachdem das Cancer and Leukemia Group Boston (CALGB) Protokoll 8541 demonstrieren konnte, daß Patientinnen, die mit einer dosisintensivierten anthrazyklin-(adriamycin)-haltigen Chemotherapie behandelt wurden, ein signifikant längeres progressionsfreies Intervall und auch Gesamtüberleben hatten, wenn ihr Primärtumor eine hohe HER-2/*neu*-Expression zeigte, sollte dieses Phänomen in einer größeren Gruppe weiter untersucht werden. In einer Untergruppe von 992 Patientinnen mit Brustkrebs aus der CALGB 8541 konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen HER-2/*neu*-Expression und CAF-Therapie (Cyclophosphamid, Doxorubicin(Adriamycin) und 5-Fluorouracil) festgestellt werden [53].

In einer weiteren Studie (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) protocol B-11) wurden 638 Brustkrebspatientinnen entweder mit L-Phenylalanin-Mustard plus 5-Fluorouracil (PF) oder PF plus Doxorubicin behandelt. In 37.5% der Tumoren konnte immunhistochemisch eine Überexpression des Proto-Onkogens nachgewiesen werden. Diese Gruppe profitierte signifikant von der Zugabe von Doxorubicin zur Therapie in Bezug auf das progressionsfreie Intervall jedoch nicht auf das Gesamtüberleben [54].

In einer 211 Brustkrebspatientinnen umfassenden deutschen Studie zum selben Thema wurden 152 Patientinnen mit einer Mitoxantron-haltigen Chemotherapie behandelt (=Anthrazyklin-Analogon) und 59 Patientinnen mit der konventionellen CMF-Therapie. In dieser retrospektiven Studie konnte zwar der Einfluß von HER-2/*neu* (Bestimmung im Serum) auf das Überleben bestätigt werden; ein Einfluß in Abhängigkeit von der jeweiligen Chemotherapie konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [55]. Auch weitere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen HER-2/*neu* und anthrazyklinhaltiger Chemotherapie erkennen [56-59].

Andere klinische Studien fanden deutlich verbesserte Ansprechraten der HER-2/*neu*-positiven Tumoren auf Paclitaxel im Vergleich zu HER-2/*neu*-negativen Tumoren [60; 61]. Der Mechanismus, der die Interaktion zwischen gesteigerter Paclitaxelsensitivität und HER-2/*neu*-Überexpression erklären könnte, ist bis jetzt unbekannt [62]. In-vitro Studien zeigten vielmehr eine gesteigerte Resistenz HER-2/*neu*-überexprimierender Zelllinien gegenüber Paclitaxel [62; 63]. Die Signaltransduktion durch HER-2/*neu* soll das Protein p21<sup>waf1</sup> hochregulieren, welches wiederum die p34cdc2-Kinase inhibiert, durch die Taxol seine apoptotische Aktivität entfaltet [64].

Die Schwierigkeit in der Validierung der meisten Studien besteht darin, daß Ergebnisse retrospektiv gewonnen werden. Nur randomisierte prospektive Studien könnten mit

ausreichender statistischer Signifikanz Zusammenhänge zwischen HER-2/*neu*-Überexpression und therapeutischer Implikation erkennen. Patientinnen werden oft schon vor der zu untersuchenden adjuvanten Therapie behandelt, so daß nicht eruierbar ist, ob jeweilige Effekte auf die untersuchte Therapie oder auf eine schon vorausgegangene zurückzuführen sind [65].

### Perspektiven in der Therapie

Ein vielversprechender neuer Therapieansatz stellt die Therapie mit Antikörpern dar, die genau gegen das HER-2/*neu*-Protein gerichtet sind [66].

In einer Phase II-Studie mit therapierefraktären metastasierten Brustkrebspatientinnen wurde der monoklonale rekombinante HER-2/*neu*-Antikörper Herceptin mit Cisplatin kombiniert. Die Kombination von Antikörper und Cisplatin resultierte bei HER-2/*neu*-überexprimierenden Tumoren in klinischen Ansprechraten, die höher waren als diejenigen mit jeweils nur einer Therapie, also Cisplatin oder Antikörper. Der Effekt des Antikörpers scheint möglicherweise darin zu bestehen, daß die HER-2/*neu*-überexprimierende Zelle nach Behandlung mit dem Antikörper nicht mehr in der Lage ist, Cisplatin-induzierte DNA-Schäden zu reparieren [67]. Weitere Studien zeigen, daß Herceptin der erste anti-HER-2/*neu*-Antikörper ist, der einen Überlebensvorteil für Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom bei Her-2/*neu*-positiven Tumoren bietet [68; 69].

Auch in der Hormontherapie scheint der therapeutische Ansatz mit Antikörpern erfolgversprechend. Die Effekte des 4D5-Antikörpers auf das Wachstum von BT474-Brustkrebszelllinien, die HER-2/*neu* und den Östrogenrezeptor überexprimieren, wurden *in vitro* untersucht. Tamoxifen und der HER-2/*neu*-Antikörper zeigten eine Zellwachstumshemmung im Vergleich zur alleinigen Gabe von jeweils nur einer Substanz [70]. Weitere Therapieversuche stellen Inhibitoren der Tyrosinkinase dar [71]. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Patientinnen mit DCIS gezielt Antikörper gegen das HER-2/*neu*-Protein bilden können [33]. Dies wiederum könnte dazu führen, daß die Entstehung eines invasiven Tumors verhindert wird bzw. eine für die Patientin prognostisch vorteilhafte Selektion von HER-2/*neu*-negativen Tumorzellen stattfindet. Diese These kann allerdings nur in einer groß angelegten Untersuchung von Patientinnen mit DCIS verifiziert werden [33]. Trotzdem erscheint die aktive Immuntherapie als mögliche therapeutische Option [72].

### 1.4. Nachweismethoden von HER-2/*neu*

Die Bedeutung der HER-2/*neu*-Bestimmung als prädiktiver Parameter für bestimmte Chemotherapien ist also noch umstritten. Es existiert darüber hinaus noch keine allgemein anerkannte und standardisierte Methode, die zuverlässige, reproduzierbare und prognostisch eindeutige Ergebnisse liefert [73].

Techniken, die bis jetzt in Studien Verwendung finden konnten, beinhalten gentechnische Verfahren, welche die Amplifikation des Gens nachweisen, sowie Southern und Slot Blots, Polymerase Chain Reaction (PCR), und neuerdings auch in situ-Hybridisierungen (fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Techniken).

Die Überexpression von HER-2/*neu* wird qualitativ und quantitativ mittels Immunhistochemie (IHC) an gefrorenen oder archiviertem Gewebe mit Western Blots oder Enzymimmunoassays (ELISA) bestimmt.

#### Southern und Slot Blot

Die Ergebnisse, die bis jetzt mittels Southern- und Slot Blot-Verfahren gewonnen werden konnten, differieren untereinander deutlich. Der Southern und Slot Blot sind teure und zeitintensive Nachweisverfahren, die frisches oder gefrorenes Gewebe benötigen.

#### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Relativ neu ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Sie kann als gut reproduzierbare und extrem zuverlässige Methode die HER-2/*neu*-Genamplifikation am frischen und gefrorenen Tumor und auch am Paraffinschnitt, ebenso wie aus sehr geringen Tumormengen (Feinnadelbiopsie) nachweisen [74]. Die bis jetzt veröffentlichten Studien mit der FISH-Technik konnten HER-2/*neu* mit dem Krankheitsverlauf korrelieren [75; 76].

#### Immunhistochemie

Die Mehrheit der veröffentlichten Studien gewann ihre Ergebnisse durch die immunhistochemische Untersuchung des Paraffinschnitts [77]. Hierbei kam es in Hinblick auf

den prognostischen und prädiktiven Wert von HER-2/*neu* zu sehr unterschiedlichen Resultaten.

Durch die Paraffinfixierung des Tumors unterliegt der HER-2/*neu*-Proteingehalt etlichen Störgrößen, wie z.B. der Fixierungszeit, -temperatur, Aufbewahrungszeit. Es existiert auch kein einheitliches Scoring-System für die Auswertung der Proteinüberexpression [5]. Die Tatsache, daß bei der Immunhistochemie (IHC) viele verschiedene Antikörper benutzt werden, könnte die Verlässlichkeit der Ergebnisse ebenfalls beeinträchtigen. Eine Untersuchung von 6 kommerziell erhältlichen Antikörpern für die immunhistochemische Bestimmung konnte zeigen, daß die Ergebnisse durch unspezifische Bindungen entscheidend beeinflußt werden und zu falsch-positiven Ergebnissen führen können [78]. Die immunhistochemische Bestimmung von 187 Paraffinschnitten von Brusttumoren mit 7 polyklonalen und 21 monoklonalen Antikörpern konnte ebenfalls zeigen, daß die erzielten Ergebnisse je nach Antikörper äußerst variabel ausfielen. Dies erklärt einerseits die unterschiedlichen Angaben über die prozentuale Überexpression von HER-2/*neu* im Tumor und andererseits die unterschiedlichen Angaben über prognostische und prädiktive Aussagekraft des Onkogens [79]. Erstrebenswert ist deshalb, einen möglichst spezifischen Antikörper zu entwickeln [80].

Ein Vergleich der IHC mit der FISH konnte zeigen, daß zwischen beiden Methoden lediglich eine Konkordanz von 56% bestand. In einem Kollektiv von 112 nodal-negativen Brustkrebspatientinnen war die prognostische Aussagekraft ermittelt durch FISH größer als die durch IHC [81]. In einer Studie von Isola et al. liegt die Konkordanz zwischen FISH und IHC bei 90% [82].

### ELISA, PCR und Western Blot

Mit der ELISA-Technik kann man den Antigenverlust durch Fixierung und Lagerung umgehen, da die Untersuchung an Tumorcytosol direkt erfolgt. Allerdings reicht oftmals die Größe der entnommenen Brusttumoren nicht aus, um eine genügend große Menge an Cytosol herzustellen. In einer Untersuchung an 415 invasiven Mammakarzinomen konnten jeweils für PCR und ELISA gleiche Informationen über den HER-2/*neu*-Status gewonnen werden [83].

Der Western Blot ist für die Routineuntersuchung nicht geeignet [5].

### 1.5. HER-2/*neu*-Bestimmung im Serum

#### ELISA

Die Tatsache, daß die extrazelluläre Domäne von HER-2/*neu* von der Zelloberfläche abgegeben wird und als Protein mit einem Molekulargewicht von 105 kDa im Serum nachweisbar ist ("shed antigen", p105, ECD), eröffnet neue diagnostische Möglichkeiten. Dadurch, daß der Antigenspiegel im Serum auch mit der Höhe der HER-2/*neu*-Expression im Primärtumor korreliert [84], können aussagekräftige Schlußfolgerungen eventuell allein durch die Bestimmung im Serum gezogen werden.

Der Vorteil der Bestimmung im Serum liegt darin, daß kein Gewebe benötigt wird, sondern man auf leicht zu gewinnende Blutproben zurückgreifen kann. Dadurch wird auch die Bestimmung bei nicht-operierten oder metastasierten Brustkrebspatientinnen möglich. Ein weiterer Vorteil der ELISA-Bestimmung liegt darin, daß er als quantitative Methode den Vergleich mit anderen biologischen Parametern erleichtert [85]. Der Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (kurz: ELISA) bietet sich als einfach durchzuführende Methode für größere Probenmengen in der Klinik an. In einer Untersuchung zu möglichen Störfaktoren des ELISA konnte für veränderte Transport- und Lagerungsbedingungen kein Einfluß auf die Ergebnisse ermittelt werden. Somit stellt sich der ELISA als wenig störanfällige Nachweismethode dar [86].

Eine der ersten Studien an einem größeren Patientinnenkollektiv (n=208) und 69 Kontrollpersonen mittels ELISA mit monoklonalem Antikörper gab erhöhte Werte von HER-2/*neu* in einem Viertel der Brustkrebspatientinnen und in keiner der gesunden Kontrollpersonen an [87]. Dittadi et al. stellten weiterhin fest, daß nach Bestimmung von p105 mit ELISA eine Einteilung der erhaltenen Werte in Quartile die Erkennung eines Hochrisikokollektivs ermöglicht, das heißt, daß das Quartil mit den höchsten HER-2/*neu*-Werten ein besonders kurzes progressionsfreies Intervall zeigt. Somit bietet die quantitative

Bestimmung (ng/ml, U/ml oder mol/ml) Vorteile gegenüber qualitativen Verfahren, da sie eine genauere Definition eines Hochrisikokollektivs ermöglicht [88].

Die meisten Studien, die ELISAs benutzten, konnten eine Beziehung zwischen zirkulierendem HER-2/*neu*-Antigen und Prognose herstellen. So scheint ein hoher HER-2/*neu*-Spiegel im Serum signifikant mit kürzerem progressionsfreiem Intervall einherzugehen [89]; und das Auftreten von Metastasen vorhersagen zu können [90]. Willsher et al. konnten in ihrer Studie die prognostische Bedeutung von HER-2/*neu* bestätigen, sahen jedoch keinen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Hormontherapie [91]. Volas et al. konnten dem HER-2/*neu*-Wert im Serum weder eine prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf noch einen Effekt auf das Ansprechen auf die Hormontherapie zuschreiben [92]. Auch für das Ansprechen auf die Chemotherapie konnte dem HER-2/*neu*-Wert im Serum keinerlei Bedeutung zugewiesen werden [93]. Allerdings erlaubte die Betrachtung des HER-2/*neu* Spiegels im Serum vor der Chemotherapie in einer Untergruppe von Patientinnen mit mehr als drei befallenen Lymphknoten eine prognostische Aussage über das Therapieansprechen und das progressionsfreie Intervall [94].

### 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die prognostische und prädiktive Bedeutung des Proto-Onkogens HER-2/*neu* bei metastasiertem Mammakarzinom zu untersuchen.

Als erster Schritt sollte ein Nachweisverfahren etabliert werden, mit dem auch in der metastasierten Situation sicher die HER-2/*neu*-Überexpression der Metastasen ermittelt werden kann. Da Gewebeproben in der metastasierten Situation schwierig oder gar nicht zu gewinnen sind, wurde die Bestimmung im Serum mittels ELISA durchgeführt. Zur Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) wurde der HER-2/*neu*-Status zusätzlich in einem altersentsprechenden Normalkollektiv (n=30) bestimmt.

Des Weiteren wurde an 29 Primärtumoren untersucht, ob die immunhistochemisch ermittelte HER-2/*neu*-Überexpression am Primärtumor mit der Bestimmung im Serum zum Zeitpunkt der Metastasierung korreliert.

Außerdem wurde ermittelt, ob sich Unterschiede ergeben im progressionsfreien Intervall und Gesamtüberleben und in Anzahl und Lokalisation der Metastasen in Abhängigkeit von HER-2/*neu*. Da die palliative Chemotherapie mit Taxanen äußerst kostenintensiv ist, wurde

versucht, mit Hilfe von HER-2/*neu* eine Subgruppe von Patientinnen zu definieren, die von einer taxanhaltigen Chemotherapie profitieren können.

Ergänzend wurde noch der Wert als möglicher Tumormarker untersucht, indem HER-2/*neu* mit dem etablierten Tumormarker CA 15-3 korreliert wurde. Es wurde ermittelt, ob eine Veränderung von HER-2/*neu* unter der Therapie auch eine Bedeutung bezüglich des Therapieansprechens hat.

1. Bestimmung des Grenzwertes von HER-2/*neu* im Serum durch Normalkollektiv (n=30) und Patientinnenkollektiv (n=103)
2. Korreliert die Höhe von HER-2/*neu* im Serum zur HER-2/*neu*-Expression im Primärtumor?
3. Lassen sich durch die Bestimmung im Serum Aussagen machen über
  - a) bestes Ansprechen unter der Therapie?
  - b) progressionsfreies Intervall?
  - c) Gesamtüberleben?
  - d) Anzahl der Metastasen?
  - e) Lokalisation der Metastasen?
4. Ergeben sich Unterschiede im Ansprechen/ im progressionsfreien Intervall/ im Gesamtüberleben in Abhängigkeit von einem der beiden Chemotherapieschemata in Abhängigkeit von der Höhe des HER-2/*neu*-Wertes im Serum?
5. Wert als Tumormarker:
  - a) Korreliert HER-2/*neu* mit dem etablierten Tumormarker CA 15-3?
  - b) Hat eine Veränderung von HER-2/*neu* unter der Therapie (Abfall oder Anstieg) auch eine Bedeutung bezüglich des Therapieansprechens?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Normalkollektiv

Als Normalkollektiv wurden 30 freiwillige Blutspenderinnen ab einem Alter von 45 Jahren verwendet (Mittelwert = 49 Jahre; Median = 45 Jahre).

Der Informations- und Einwilligungsbogen für die Blutspenderinnen (s. Anhang) wurde von der Stabsstelle des Ärztlichen Direktors für Medizinische Qualitätssicherung im UKE auditiert und bewilligt.

#### 2.1.2. Patientinnen aus der AGO-Studie

Für die vorliegende Arbeit wurde das Serum von 103 Patientinnen untersucht, die im Rahmen einer Studie der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft (AGO) behandelt wurden: „Epirubicin und Paclitaxel versus Epirubicin und Cyclophosphamid in der first-line Therapie bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom - Therapieoptimierung“.

Die Untersuchung der prätherapeutischen Seren konnte durch Bestimmungen der Seren nach 2-3monatiger Behandlungsdauer (=Zeitpunkt 1) und 4monatiger und längerer Behandlungsdauer (=Zeitpunkt 2) ergänzt werden.

Tiefgefrorene Aliquote der Seren wurden uns in folgender Anzahl aus verschiedenen Kliniken in Deutschland zur Verfügung gestellt:

- 23 Seren aus der Frauenklinik der Technischen Universität München,
- 13 Seren und 11 Verlaufskontrollen (2 zum Zeitpunkt 1; 9 zum Zeitpunkt 2) aus der Universitäts-Frauenklinik Ulm,
- 8 Seren, 7 Verlaufskontrollen zum Zeitpunkt 1 und 7 Verlaufskontrollen zum Zeitpunkt 2 aus dem Zentrum der Frauenheilkunde in Frankfurt,
- 4 Seren aus der Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover und
- 4 Seren aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Greifswald.
- 51 Seren von Patientinnen, die sich in der Universitäts-Frauenklinik Hamburg in Therapie befanden, wurden zusammen mit 37 Verlaufskontrollen zum Zeitpunkt 1 und 32 Verlaufskontrollen zum Zeitpunkt 2 untersucht.

Somit ergaben sich 103 Serumproben vor Therapiebeginn, 46 Serumproben zum Zeitpunkt 1 und 48 Serumproben zum Zeitpunkt 2 (Tab.1).

Klinik	Anzahl prätherapeutischer Seren	Anzahl der Seren nach 2-3monatiger Behandlungsdauer	Anzahl der Seren nach 4monatiger oder längerer Behandlungsdauer
Frauenklinik der TU München	23	-	-
Universitäts-Frauenklinik Ulm	13	2	9
Zentrum der Frauenheilkunde in Frankfurt	8	7	7
Frauenklinik der Med. Hochschule Hannover	4	-	-
Klinik für Frauenheilkunde+ Geburtshilfe der Uni Greifswald	4	-	-
Universitäts-Frauenklinik Hamburg	51	37	32
<b>Insgesamt</b>	<b>103</b>	<b>46</b>	<b>48</b>

**Tabelle 1:** Anzahl der Seren aus den teilnehmenden Kliniken vor Therapiebeginn, nach 2-3monatiger Behandlungsdauer (=Zeitpunkt 1) und nach 4monatiger und längerer Behandlungsdauer (=Zeitpunkt 2).

### AGO-Studie

Titel der AGO-Studie ist „Epirubicin und Paclitaxel versus Epirubicin und Cyclophosphamid in der first-line Therapie bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. – Therapieoptimierung –“.

In die AGO-Studie wurden 597 Patientinnen mit histologisch gesichertem, metastasiertem Mammakarzinom ohne vorausgehende Chemotherapie der metastasierten Erkrankung eingeschlossen, wobei eine vorherige palliative Hormon-, Radio- und/oder Chemotherapie gestattet war. Die Studie wurde als prospektive, offene, randomisierte, multizentrische Phase III-Studie gestaltet. In jedem Behandlungsarm wurde alle 21 Tage ein Zyklus mit der jeweiligen Chemotherapie durchgeführt. Die Fortsetzung der Therapie durfte bis zu einer

maximalen Anzahl von 10 Zyklen erfolgen. Das Ansprechen auf die Therapie wurde gemäß UICC-Kriterien in komplette Remission (CR), partielle Remission (PR), keine Veränderung (NC) und Progression (PD) eingeteilt. Der Therapieabbruch erfolgte bei Tumorprogression.

### Einschlußkriterien

- histologisch gesichertes metastasiertes Mammakarzinom
- Abschluß einer früheren adjuvanten Chemotherapie > 12 Monate, einer vorherigen Radio- und/oder Immuntherapie  $\geq$  4 Wochen vor Aufnahme in die Studie, einer palliativen Hormontherapie vor der ersten Gabe der Prüfmedikation; intakte Knochenmarksfunktion nach einer lokalen Radiatio
- durch körperliche und radiologische Untersuchung zweidimensional meßbarer Herd
- negativer Schwangerschaftstest bei fertilen Frauen und Bereitschaft zur Kontrazeption
- Alter: 18 bis 75 Jahre
- Lebenserwartung  $\geq$  12 Wochen

### Ausschlußkriterien

- Weiteres Karzinom (Ausnahme: Carcinoma *in situ* der Zervix, Hautkarzinome außer malignen Melanomen)
- Frühere Chemotherapie mit Anthrazyklinen mit einer kumulativen Dosis von  $>300\text{mg}/\text{m}^2$  Doxorubicin oder  $>420\text{ mg}/\text{m}^2$  Epirubicin
- Vorherige Chemotherapie oder mehr als eine Hormontherapie im metastasierten Stadium
- Knochenmetastasen als einziger meßbarer Karzinomherd
- Applikation anderer Chemo- oder Immuntherapeutika im Verlauf der Studie
- Hirnmetastasen und andere neurologische Erkrankungen
- Schwangerschaft, Stillzeit oder fehlende Kontrazeption bei fertilen Frauen

Aufgrund der Selektion des Kollektivs handelt es sich um Patientinnen mit mäßigem oder hohem Risiko für ein verkürztes progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben.

Die relevanten Daten der Patientinnen wurden uns durch den für die Betreuung und Auswertung der Studie zuständigen wissenschaftlichen Dienst (WiSP=Wissenschaftlicher Service Pharma, Langenfeld) zugesandt. Ergänzend konnten von den in Hamburg behandelten

Patientinnen notwendige Daten aus den Krankenunterlagen entnommen und vervollständigt werden (z.B. Follow-up).

### 2.1.2. Tumormarker CA 15-3

Die Werte des Tumormarkers CA 15-3, dessen Bestimmung aus den Seren schon in der Abteilung für Klinische Chemie an der Universitätsklinik Eppendorf stattgefunden hatte, konnte mit den ermittelten HER-2/*neu*-Werten korreliert und verglichen werden.

### 2.1.3. Paraffinschnitte des Primärtumors

An den in der Gynäkopathologie der Universitäts-Frauenklinik asservierten Paraffinschnitten der Primärtumoren von 29 Patientinnen konnte immunhistochemisch die HER-2/*neu*-Überexpression am Primärtumor bestimmt werden.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. ELISA

Die Blutproben wurden 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend abpipettiert und bei  $-23^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### Meßprinzip

Der Oncogene Science, Inc. (Manhasset, NY) HER-2/*neu*-Assay OSDI-10 ist ein Sandwich-Immuno-Assay, der einen monoklonalen Mausantikörper zur Bindung und einen anderen monoklonalen Mausantikörper zum Nachweis des humanen *neu*-Proteins benutzt. Das Bindungs- und das Detektionssystem reagieren spezifisch mit der extrazellulären Domäne des *neu*-Proteins (105kDa). Die Mikrotiterplatte ist mit dem ersten Antikörper beschichtet. Bei Zugabe des Antigens (HER-2/*neu* im Serum) findet eine Antigen-Antikörper-Bindung statt, die durch den Detektionsantikörper unter Zugabe eines Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes sichtbar gemacht und im ELISA-Reader bei 492 nm quantitativ bestimmt werden kann.

#### Material/Lösungen

- Mikrotiterplatte mit 96 beschichteten wells
- *neu* Standards: 6 verschiedene definierte Konzentrationen (ng/ml) von rekombinantem p105

- 3 *neu* Kontrollen in unbekanntem Konzentrationen
- Sample Diluent: BSA und 0.1% Natriumazid
- Detektorantikörper: Antikörper in 0.01 M PBS (Phosphate-Buffered Saline) (pH 7.4), Proteinstabilisator und 0,1% Natriumazid
- Conjugate Diluent: 0,01 M PBS (pH 7,4), BSA und 0,01 % Chlorazetamid
- Conjugate Concentrate: 50X Streptavidin-Horseradish-Peroxidase in Pufferlösung
- Substrate Diluent: 0,1 M Citratpuffer (pH 5,0) und 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Substrate: O-Phenylendiamin(OPD)-Tabletten
- Stopplösung: 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Waschkonzentrat (20X)
- Brutschrank (37°C)
- Pipetten; 2-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl mit austauschbaren Pipettenspitzen
- Multipipetten
- Reagenzgläser zur Probenvorbereitung
- ELISA-Reader mit einer Wellenlänge von 490 (488-492) nm
- Destilliertes Wasser

### Durchführung

Für alle Proben und Kontrollen ist eine initiale Verdünnung von 1:50 mit Sample Diluent notwendig: zu 980µl Sample Diluent werden 20µl Serum hinzupipettiert. Die Standards, Kontrollen und Proben wurden in Duplikaten gemessen.

In 2 Röhrchen wurden je 100 µl Sample Diluent als Leerwert pipettiert. Daraufhin wurden je 100µl der Standards in aufsteigender Konzentration, 100µl der Kontrollen und schließlich 100 µl der verdünnten Proben in die Röhrchen pipettiert. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Platten drei Mal mit 1:19 verdünntem Waschpuffer gewaschen. Zur Herstellung des Puffers wurden 50ml Waschpuffer mit 950 ml destilliertem Wasser versetzt. Anschließend wurde in jedes Röhrchen mit Ausnahme der Leerwerte 100µl des Detektionsantikörpers pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für eine Stunde. In der Zeit wurde das Working Conjugate vorbereitet (Tab.2). Nachdem die Platten wiederum drei Mal gewaschen worden waren, konnte das vorbereitete Working Conjugate in alle Röhrchen außer in die Leerwerte pipettiert werden. Danach wurde die abgedeckte Platte bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Working Substrate lichtgeschützt vorbereitet (Tab.2). Nach dem letzten Waschvorgang konnte das Working

## 2. Material und Methoden

Substrate zu je 100µl in jedes Röhrchen pipettiert werden. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 45 Minuten. Abschließend wurden je 100µl Stopplösung in alle Röhrchen pipettiert. Jetzt konnte innerhalb von 30 Minuten das Ergebnis im ELISA-Reader (Titertek Multiskan® MK II von Labsystems, Finnland) bei 492 nm abgelesen werden.

### Vorbereitung der Reagenzien des Assays

Anzahl der verwendeten Reihen	Conj.Concentrate	Conj.Diluent	Tablets	Substrate Diluent
1	20µl	0,98 ml	1	4 ml
2	40µl	1,96 ml	1	4 ml
3	60µl	2,94 ml	1	4 ml
4	80µl	3,92 ml	1	4 ml
5	100µl	4,90 ml	2	8 ml
6	120µl	5,88 ml	2	8 ml
7	140µl	6,86 ml	2	8 ml
8	160µl	7,84 ml	2	8 ml
9	180µl	8,82 ml	3	12 ml
10	200µl	9,80 ml	3	12 ml
11	220µl	10,78 ml	3	12 ml
12	240µl	11,76 ml	3	12 ml

**Tabelle 2:** Schema zur Vorbereitung des Working Conjugate und des Working Substrate.

### Zusammenfassung des Verfahrens

Arbeitsschritte	Inkubation
1. Zugabe der Standards, Kontrollen und Proben in die Röhrchen	3 Std. bei 37°C
2. 3 x Waschen	
1. Zugabe des Detektionsantikörpers in die Röhrchen	1 Std. bei 37°C
2. 3 x Waschen	
3. Zugabe des Konjugates (Streptavidin-Horseradish-	30 Min. bei RT*

Peroxidase) in die Röhrchen	
4. 3 x Waschen	
5. Zugabe von Substratlösung (O-Phenylendiamine) in die Röhrchen	45 Min. bei RT*
6. Zugabe der Stopplösung (2,5 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) in die Röhrchen	
7. Lesen der Platte bei 492 nm	

\*RT=Raumtemperatur

### Auswertung

Bezugspunkt für die Meßwerte der Patientinnenproben ist eine Kurve, die anhand der Koordination der Standardmeßwerte erstellt wird (Abb. 1 und 2). Hierbei wurden die jeweils gemessenen Mittelwerte der sechs Einzel-Extinktionen (E=492 nm) auf der Y-Achse gegen die entsprechenden sechs Konzentrationen mit genau definiertem HER-2/*neu*-Gehalt (ng/ml) auf der X-Achse aufgetragen.

Es ergab sich eine annähernd lineare Standardkurve (Abb.2). Über die gemittelte Extinktion der Kontrollen und Proben ist es möglich, die Konzentrationen derselbigen direkt durch Computerberechnung (Programm eia3 von Labsystems, Finnland) abzuleiten. Anschließend wurde überprüft, ob die bestimmten Werte für die Kontrollen im angegebenen Referenzbereich lagen. Bei Abweichen der doppelt gemessenen Werte voneinander um mehr als 10 Prozent mußte dieser Wert im nächsten Versuch neu ermittelt werden.

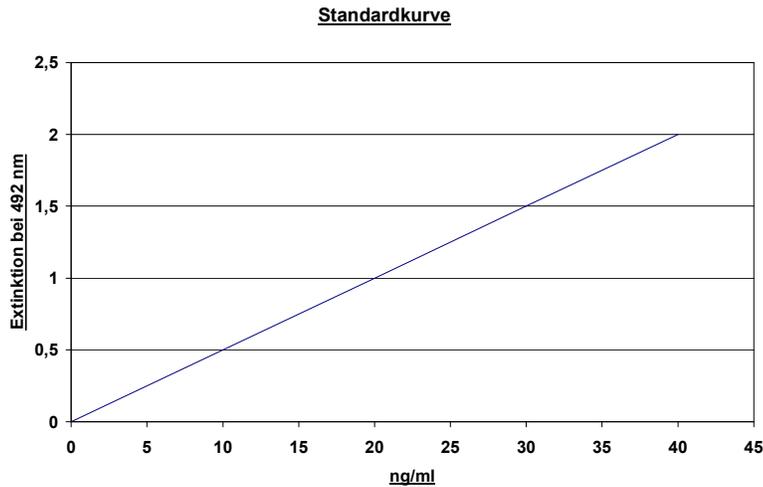
Falls die Konzentration der gemessenen Probe über dem Referenzbereich lag, mußte die Probe in weiteren Verdünnungsschritten bestimmt werden.

Als weitere Verdünnungsschritte wurden gewählt:

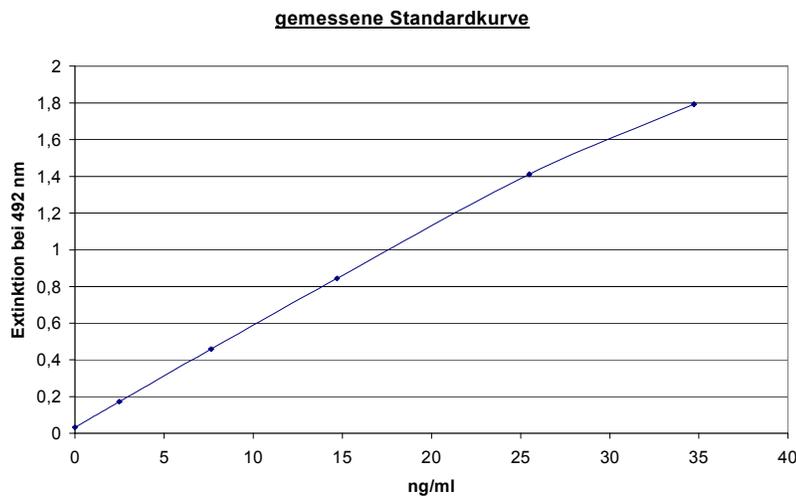
1:100 / 1:200 / 1:400 / 1:800 / 1:1600

Die gemessenen Konzentrationen mußten dann jeweils mit dem entsprechenden Faktor multipliziert werden:

2 / 4 / 8 / 16 / 32



**Abbildung 1:** Standardkurve unter definierten Konzentrationen und Extinktionen



**Abbildung 2:** tatsächlich gemessene Standardkurve

### 2.2.2. CA 15-3-Bestimmung

Die Bestimmung der CA 15-3-Konzentrationen erfolgte mit dem Abbott IMx CA 15-3 Tumormarker-Assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, USA). Der IMx CA 15-3 ist ein Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), der auf dem Einsatz von monoklonalen 115D8- und DF3-Antikörpern basiert. Der monoklonale Antikörper 115D8 ist gegen die Membranen humaner Milchfettkügelchen gerichtet, der monoklonale Antikörper DF3 gegen eine angereicherte Membranfraktion eines metastasierenden Mammakarzinoms. Die Antikörper

reagieren mit Epitopen, die als hochmolekulare Glykoproteine exprimiert werden und als polymorphe epitheliale Muzine (PEMs) bezeichnet werden.

(Untersuchung durch das klinisch-chemische Labor des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Wagener)

### 2.2.3. Immunhistochemie

#### Vorbereitung und Durchführung

Aus den Paraffinblöcken der Primärtumoren wurden 5 µm dicke Schnitte mit dem Schlittenbahnmikrotom der Firma Reichert-Jung, Deutschland, angefertigt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden in einer Pufferlösung aus Tris-base, EDTA und Tri-Natrium-Zitrat (pH 7,8) bei 600 Watt in der Mikrowelle routinemäßig vorbehandelt. Die HER-2/*neu*-Überexpression wurde mit dem 1:40 verdünnten Antikörper CB11, einem Antikörper der Klasse IgG1, der Firma Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK, untersucht. Die Färbung erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und eine anschließende Gegenfärbung wurde mit Hämalaun durchgeführt.

Die Färbung wurde in der Abteilung für Gynäkopathologie mit dem Ventana Enhanced DAB Detection Kit (Catalogue No: 250-003) durch den halbautomatischen Färbeautomaten Nexes® von Ventana Medical Systems, Tucson, USA, vorgenommen.

#### Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach dem von Remmele und Stegner vorgeschlagenen System (immunoreactive score (IRS)). [95]

Dabei wird die Färbeintensität (=staining intensity) und die Anzahl der angefärbten Zellen beurteilt (Tab.3).

Keine Färbereaktion ergibt den Wert „0“, eine schwache den Wert „1“, eine mäßige „2“ und eine starke Färbereaktion den Wert „3“.

Keine positiven, d.h. angefärbten Zellen ergeben den Wert „0“. Wenn weniger als 10 % aller Zellen positiv sind, ergibt dies den Wert „1“, 10-50% den Wert „2“, 51-80% den Wert „3“ und mehr als 80% den Wert „4“.

Anschließend werden die beiden erhaltenen Werte multipliziert.

Färbeintensität = „staining intensitiy“	Zahlenwert
Keine	<b>0</b>
Schwach	<b>1</b>
Mäßig	<b>2</b>
Stark	<b>3</b>

Prozent positiver Zellen	Zahlenwert
Keine positiven Zellen	<b>0</b>
< 10 %	<b>1</b>
10-50 %	<b>2</b>
51-80 %	<b>3</b>
> 80 %	<b>4</b>

**Tabelle 3:** Auswertung der Immunhistochemie nach Remmele und Stegner. Zuordnung eines Zahlenwertes zur Färbeintensität und zur Anzahl der gefärbten Zellen.

Der durch Multiplikation ermittelte Wert erlaubt die Unterscheidung zwischen HER-2/*neu* ist

Nicht erhöht	(Wert = 0-2)
Mittelgradig erhöht	(Wert = 3-4)
Hochgradig erhöht	(Wert = 6-12).

(Untersuchung durch die Abteilung für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Löning)

### 2.3. Statistische Auswertung

Die Schätzung des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens erfolgte mittels der Kaplan-Meier-Methode. Die Abhängigkeit des progressionsfreien Intervalls oder des Gesamtüberlebens von der Therapie oder von der Konzentration von HER-2/*neu* wurde mit dem Logrank-Test berechnet.

Als nichtparametrische Tests wurden der Wilcoxon-Test und der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) benutzt.

Die Verläufe von HER-2/*neu* oder CA 15-3 wurden mit dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben untersucht.

Die Verteilung von HER-2/*neu* in verschiedenen Prognoseparametern oder in verschiedenen Metastasenlokalisationen wurde mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) für zwei unverbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft.

Innerhalb der Stichproben wurde meist der Median als der Wert größter Aussagekraft gewertet. Daneben wurden aber auch Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum angegeben, falls dies von Interesse war.

Der Zusammenhang zwischen Immunhistochemie und Serumwert wurde durch den Spearman-Korrelationskoeffizienten, der Zusammenhang zwischen HER-2/*neu*- und CA 15-3-Wert durch den Chi-Quadrat- $(\chi^2)$ -Test bestimmt.

Für die statistische Auswertung wurde das SPSS Software Package (Version: 9.0) der Firma SPSS Inc., Los Angeles, USA, verwendet.

### 3. Ergebnisse

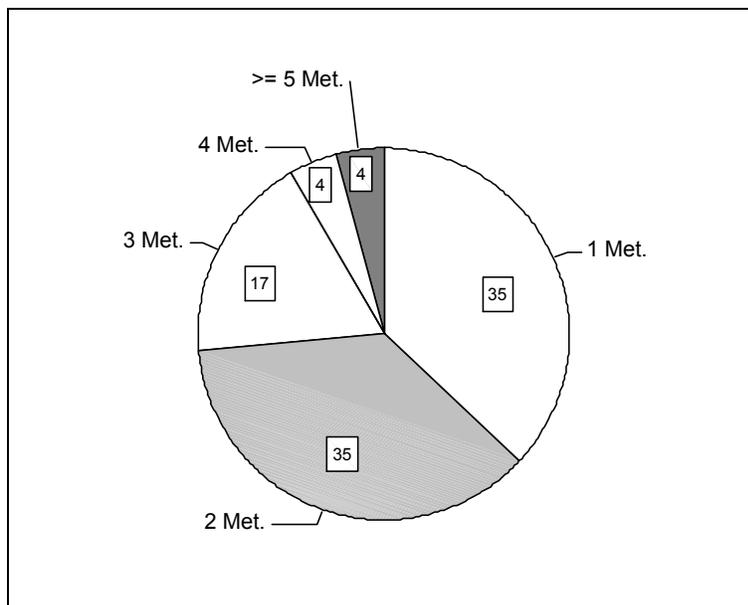
#### 3.1. Datenüberblick

Untersuchtes Merkmal		Anzahl der Patientinnen	
		Absolut	(%)
Patientinnen insgesamt		103	100
Alter bei Therapiebeginn	33-39	6	5,8%
	40-49	20	19,4%
	50-59	42	40,8%
	60-69	30	29,1%
	70-73	5	4,9%
Therapiearm	ET	49	47,6
	EC	54	52,4
Tumorstadium	PT1	21	20,4
	PT2	38	36,9
	PT3	11	10,7
	PT4	13	12,6
	unbekannt	20	18,4
Lymphknotenbefall	PN negativ	25	24,3
	pN positiv	52	50,5
	unbekannt	26	25,2
Differenzierungsgrad	G1	1	1
	G2	32	31,1
	G3	45	43,7
	unbekannt	25	24,2
Art der Operation	Brusterhaltende OP	20	19,4
	Ablatio	34	33
	Keine OP	42	40,8
	unbekannt	9	6,8
Histologischer Typ	Duktal	65	63,1
	Lobulär	10	9,7
	Sonstiges	17	16,5
	unbekannt	11	10,6
Östrogenrezeptor-Status	ER negativ	36	35
	ER positiv	53	51,5
	unbekannt	14	13,6
Progesteronrezeptor-Status	PR negativ	39	37,9
	PR positiv	50	48,5
	unbekannt	14	13,6
Adjuvante Chemotherapie	Keine	64	62,1
	Anthrazyklinhaltige	5	4,9
	CMF	25	24,3
	Andere	1	1
	unbekannt	8	7,8
Adjuvante Tamoxifentherapie	Ja	30	29,1
	Nein	73	70,9
Palliative Hormontherapie	Tamoxifen	6	5,8
	Aromatase-Inhibitoren	6	5,8
	Gestagen	0	0
	GnRH-Analoga	2	1,9
	Patientinnen insgesamt	14	13,6
Ansprechen auf die Palliative Hormontherapie	CR	1	7,1
	PR	1	7,1
	NC	0	0
	PD	12	85,8

**Tabelle 4:** Häufigkeitsverteilung der klinischen, histopathologischen und biochemischen Daten im Patientinnenkollektiv

Metastasierung	Anzahl der Patientinnen	
	absolut	(%)
Viszeral insgesamt <i>(Leber,Lunge,Peritoneum)</i>	76/95	80,0 %
Sonstiges <i>(Lymphknoten, Lokoregionär, ...)</i>	19/95	20,0 %

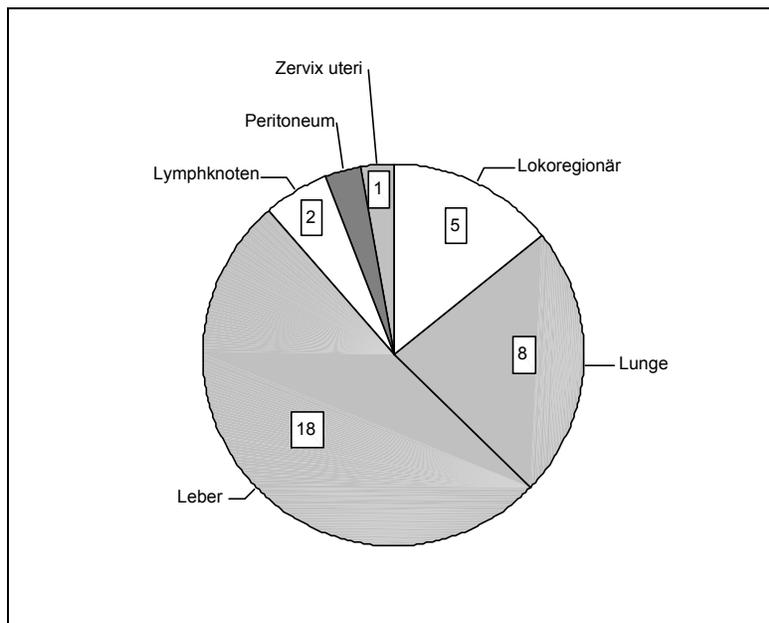
**Tabelle 5:** Anzahl der Patientinnen mit viszeraler und sonstiger Metastasenlokalisierung.



**Abbildung 3:** Anzahl der Metastasenlokalisationen.

35 Patientinnen hatten eine Metastasenlokalisierung, 35 Patientinnen hatten zwei Metastasenlokalisationen, 17 Patientinnen hatten drei Metastasenlokalisationen, 4 Patientinnen hatten vier Metastasenlokalisationen und 4 Patientinnen hatten fünf oder mehr Metastasenlokalisationen. Von 13 Patientinnen war die Anzahl der Metastasenlokalisationen

nicht bekannt. Von den 90 Patientinnen, bei denen die Metastasierung bekannt war, hatten also 60 Frauen mehr als eine Metastasenlokalisierung.



**Abbildung 4:** Betroffene Organsysteme bei Patientinnen mit nur einer Metastasenlokalisierung.

Von den 35 Patientinnen, bei denen ein Organsystem betroffen war, war die Lokalisation wie folgt verteilt: Die Leber war häufigster Ort der Metastasierung (n=18), gefolgt von der Lunge (n=8). Eine lokoregionäre Metastasierung (Thorax-Wand, restliche Mamma, axilläre und infraklavikuläre Lymphknoten) zeigten 5 Patientinnen, Befall der nicht-regionären Lymphknoten (supraklavikuläre, retrosternale Lymphknoten und Lymphknoten der Thoraxwand) zeigten 2 Patientinnen. Das Peritoneum war bei 1 Patientin befallen; die Zervix uteri war bei 1 Patientin befallen war.

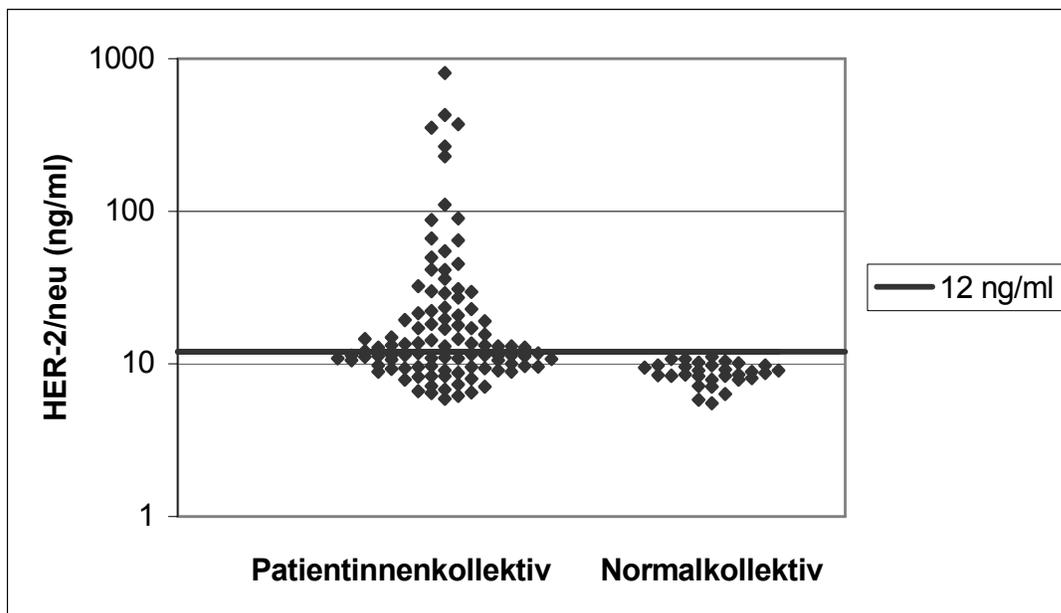
### 3.2. HER-2/neu-Konzentrationen

Die Kontrollen (n=30) hatten Serumwerte von HER-2/*neu*, die zwischen 5,5 und 11,1 ng/ml lagen (Median= 8,82 ng/ml).

Die Werte der Patientinnen (n=103) lagen mit einem Median von 12,73 ng/ml deutlich über dem Normalkollektiv (Spannweite= 5,9 – 426 ng/ml).

Die beiden Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander ( $p < 0,001$ ).

Bestimmt man den Wert von 12 ng/ml als Grenzwert, dann wiesen 51,5 % der Patientinnen erhöhte Werte auf (Abb.5).



**Abbildung 5:** Verteilung der HER-2/*neu*-Werte im Patientinnen- und Normalkollektiv. 51,5% der Patientinnen hatten HER-2/*neu*-Werte über dem Grenzwert von 12 ng/ml. Patientinnen- und Normalkollektiv unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,001$ ).

Bestimmte man die Werte von HER-2/*neu* im Serum im Verlauf der Therapie, so zeigte sich, daß sich die Werte im Median nicht wesentlich veränderten. Der Median lag bei der Bestimmung zum Zeitpunkt 1, also nach ca. 3 Zyklen Chemotherapie geringfügig niedriger (11,40 ng/ml) als vor der Therapie; die Bestimmung zum Zeitpunkt 2, also nach ca. 6 Zyklen Chemotherapie, ergab einen mit 12,08 ng/ml höheren Median, der jedoch immer noch unter dem Median der Serumbestimmung vor der Therapie lag (12,73 ng/ml) (Tab.6).

	HER-2/ <i>neu</i> vor der Therapie	HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 1	HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 2
Anzahl der Proben	103	46	48
>12 ng/ml (%)	51,5(%)	58,7(%)	37,5(%)
Median (ng/ml)	12,73	11,40	12,08
Minimum (ng/ml)	5,92	5,79	5,69
Maximum (ng/ml)	803,60	584,53	1626,25

**Tabelle 6:** HER-2/*neu*-Werte vor Beginn der Therapie (ng/ml), nach 3 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 1) und nach 6 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 2).

### 3.3. Verteilung von HER-2/*neu* innerhalb verschiedener Prognoseparameter

Die Verteilung der extrazellulären Domäne von HER-2/*neu* (ECD) ist nahezu identisch innerhalb aller in dieser Studie erhobenen Prognoseparameter. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den dargestellten Untergruppen.

Patienten-oder Tumorcharakteristik	Anzahl der Patientinnen	Anzahl > 12 ng/ml	Prozent > 12 ng/ml	p-Wert
<b>Alter</b>				
< 50 Jahre	26	11	42%	NS
>= 50 Jahre	75	41	55%	
<b>Nodalstatus</b>				
N0	25	12	48%	NS
N1	50	24	48%	
unbekannt	26			
<b>Grading</b>				
G1	1	1		NS
G2	32	15	47%	
G3	43	20	47%	
unbekannt	25			
<b>Histologie</b>				
duktal	64	31	48%	NS

lobulär	10	4	40%	
sonstiges	16	9	56%	
unbekannt	11			
Östrogenrezeptor				
positiv	34	15	44%	NS
negativ	53	26	49%	
unbekannt	14			
Progesteronrezeptor				
positiv	37	16	43%	NS
negativ	50	25	50%	
unbekannt	14			

**Tabelle 7:** Verteilung der HER-2/*neu*-Werte innerhalb verschiedener Prognoseparameter. Eine Häufung erhöhter HER-2/*neu*-Werte innerhalb der untersuchten Prognoseparameter konnte nicht ermittelt werden.

### 3.4. Korrelation der HER-2/*neu*-Befunde im Serum mit der HER-2/*neu*-Überexpression des Primärtumors

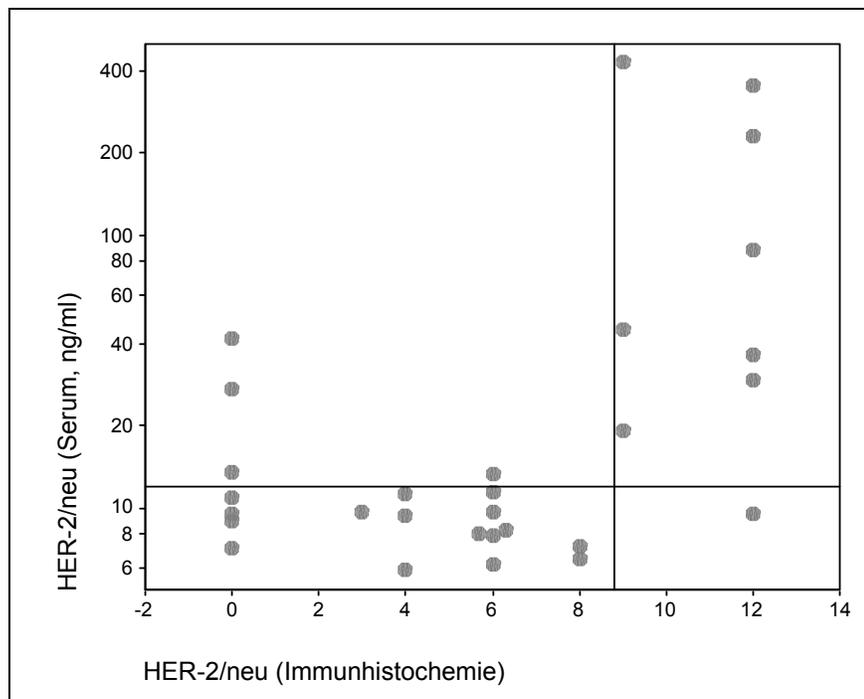
Um beurteilen zu können, inwieweit die HER-2/*neu*-Expression des Primärtumors auch Rückschlüsse auf die Höhe des Serumwertes zum Zeitpunkt der Metastasierung zulässt, wurde geprüft, ob Patientinnen mit einem Serumwert >12 ng/ml auch im Primärtumor einen Punktwert  $\geq 9$  aufwiesen bzw. Patientinnen mit Serumwerten < 12ng/ml auch im Primärtumor Werte <9 hatten. Mit diesem für die immunhistochemische Auswertung optimierten Grenzwert von 9 konnte eine signifikante Korrelation zwischen der HER-2/*neu*-Expression des Primärtumors und des Serumwertes zum Zeitpunkt der Metastasierung ermittelt werden ( $p=0,018$ ).

9 von 29 Patientinnen hatten eine erhöhte HER-2/*neu*-Expression im Primärtumor. Die mediane Konzentration von HER-2/*neu* im Serum war bei diesen Patientinnen 45,2 ng/ml. Die 20 Patientinnen mit niedriger Expression von HER-2/*neu* hatten mit der medianen HER-2/*neu* Konzentration von 9,4 ng/ml auch deutlich niedrigere Serumwerte. Dennoch zeigte eine Patientin trotz stark erhöhter Expression im Primärtumor eine Serumkonzentration <12 ng/ml. 4 Patientinnen hatten erhöhte Serumwerte, obwohl sie im Primärtumor keine deutliche Überexpression gezeigt hatten.

Immunhistochemie und ELISA stimmten in 83% der Fälle (24/29) überein (Tab.8, Abb.6).

		Immunhistochemie		N
		< 9	>= 9	
HER-2/ <i>neu</i> (Serum)	< 12	<b>16</b>	<b>1</b>	17
	>= 12	<b>4</b>	<b>8</b>	12
	N	20	9	29

**Tabelle 8:** Korrelation zwischen Immunhistochemie und ELISA ( $p=0,018$ ). Bei 24 von 29 Patientinnen stimmten Immunhistochemie und ELISA-Bestimmung überein. Bei 5 Patientinnen stimmten Immunhistochemie und ELISA-Bestimmung nicht überein.



**Abbildung 6:** Darstellung der durch Immunhistochemie und ELISA bestimmten HER-2/*neu*-Werte. Grenzwerte (12 ng/ml im ELISA und 9 in der Immunhistochemie) sind zur Orientierung eingezeichnet.

### 3.5. Bestes Ansprechen unter der Therapie

Das beste Ansprechen unter der Therapie ist in der unten dargestellten Tabelle aufgelistet (Tab.9). Es wird nach UICC-Kriterien unterschieden zwischen kompletter Remission (CR), partieller Remission (PR), keiner Veränderung (NC) und Progression (PD). Bei der Einteilung wurde nur das jeweils beste Therapieansprechen berücksichtigt, ohne daß der weitere Therapieverlauf, das progressionsfreie Intervall oder das Gesamtüberleben in Betracht gezogen wurden. Es lagen Ansprechdaten von 90 Patientinnen vor.

Ansprechen:	CR	PR	NC	PD
insgesamt	4	34	32	20
ET-Arm	3	17	15	7
EC-Arm	1	17	17	13

**Tabelle 9:** Anzahl der Patientinnen in den verschiedenen Ansprecharmen

Um das beste Ansprechen unter der Therapie in Abhängigkeit von HER-2/*neu* zu untersuchen, wurden drei Ansprechgruppen gebildet.

In einer Gruppe wurden komplette und partielle Remission (CR + PR) zusammengefaßt, da nur vier Patientinnen eine komplette Remission erreicht hatten. Diese Gruppe umfaßte 38 Patientinnen. Die Gruppe, in der es weder zur Remission noch zur Progression gekommen war (NC = no change), umfaßte 32 Patientinnen. In der dritten Gruppe befanden sich 20 Patientinnen, deren Krankheit unter der Therapie progredient gewesen war (PD=progressive disease).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen prätherapeutischen HER-2/*neu* Werten und bestem Ansprechen unter der Therapie gefunden werden ( $p > 0,05$ ) (Tab. 10, Abb.7+8).

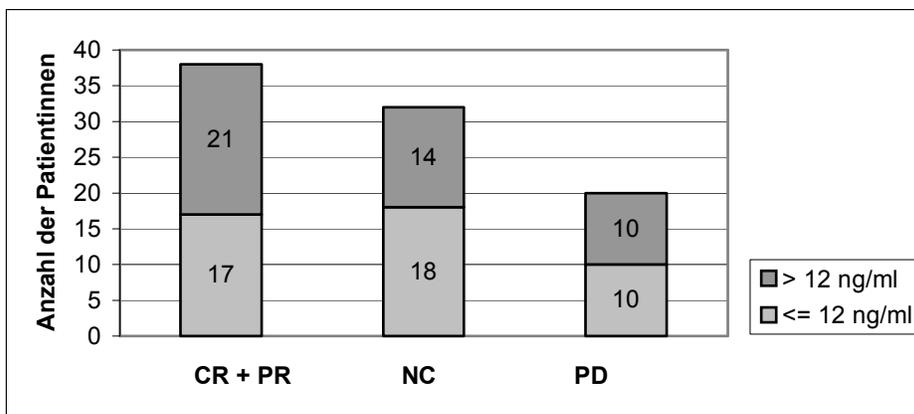
Ansprechen	Anzahl	Median	Minimum	Maximum (ng/ml)
CR+PR:	n=38	13,0	5,92	803,6
NC:	n=32	11,18	6,52	372,19

---

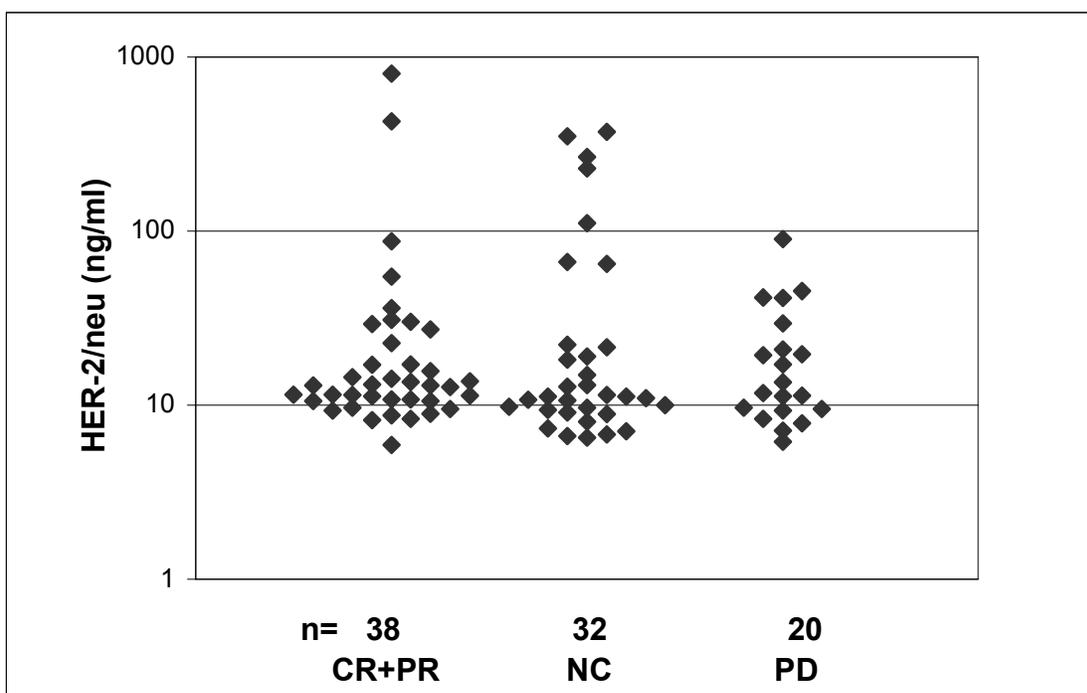
PD:            n=20            11,72            6,15            89,69

---

**Tabelle 10:** Gleichmäßige Verteilung der HER-2/*neu*-Werte in den verschiedenen Ansprecharmen. Der Median in der Gruppe „CR + PR“ lag geringfügig über den Medianen der anderen Ansprechgruppen ( $p>0,05$ ).



**Abbildung 7:** Anzahl der Patientinnen in den Ansprechgruppen in Abhängigkeit von HER-2/*neu*. Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten größer und kleiner 12 ng/ml waren in allen Ansprechgruppen annähernd gleich verteilt ( $p>0,05$ ).



---

**Abbildung 8:** Gleichmäßige Verteilung der HER-2/*neu*-Werte in den verschiedenen Ansprechgruppen.

Auch für die Unterscheidung zwischen den beiden Therapiearmen konnte für keinen Therapiearm ein Zusammenhang zwischen HER-2/*neu* vor der Therapie und dem besten Ansprechen unter der Therapie entdeckt werden ( $p>0,05$ ) (Tab.11, Abb.9+10+11). Die Zugabe von Paclitaxel ergab kein besseres Ansprechen.

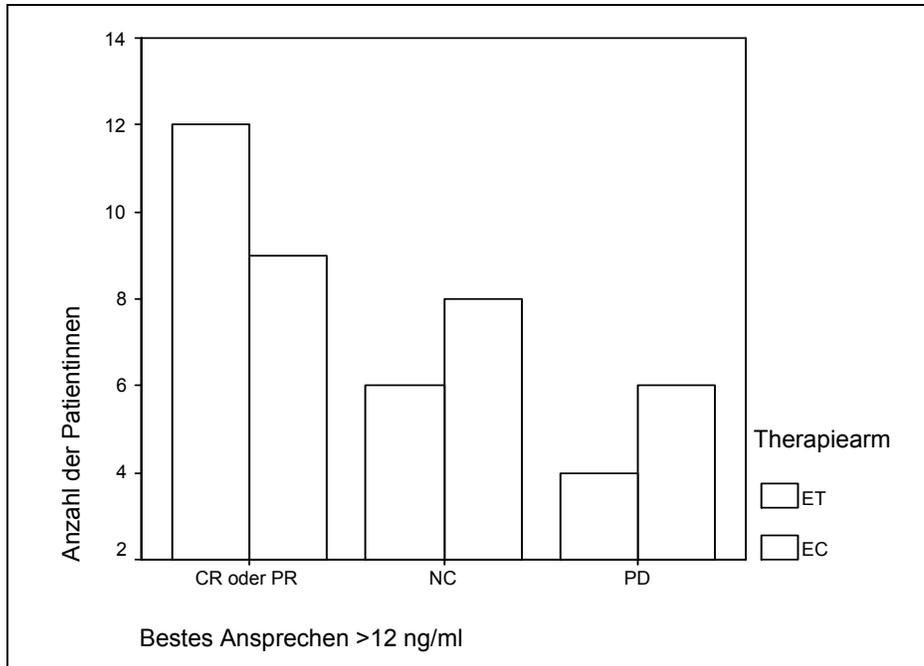
Für die drei Ansprechgruppen ergaben sich folgende HER-2/*neu* Werte (ng/ml):

---

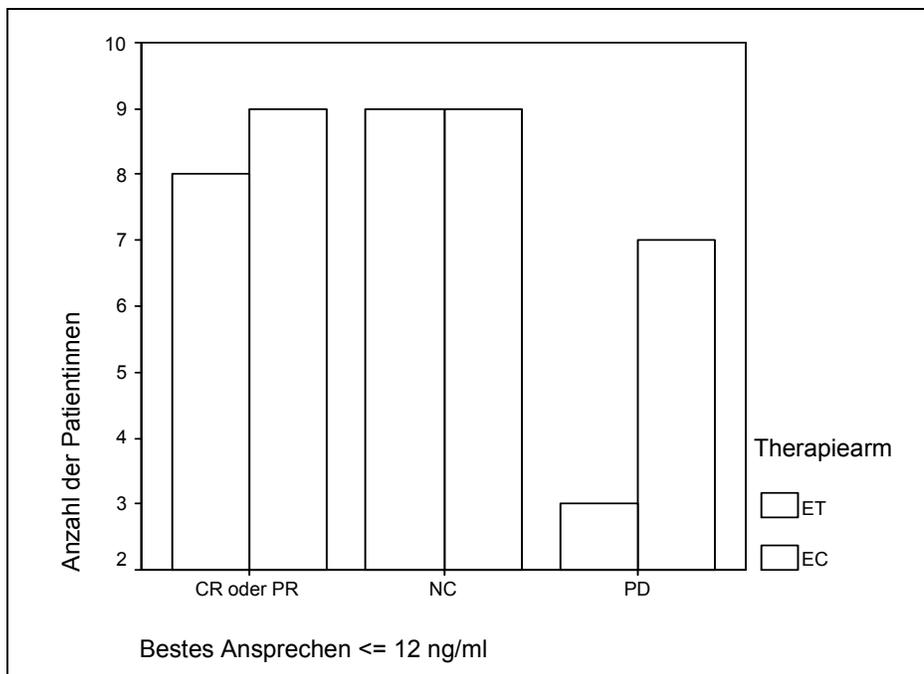
Ansprechen	Th.	Median	Minimum	Maximum (ng/ml)
CR+PR	ET	13,0	5,92	803,6
	EC	13,18	8,19	54,67
NC	ET	10,72	6,8	352,5
	EC	11,40	6,52	372,19
PD	ET	13,49	6,15	41,47
	EC	11,55	7,16	89,69

---

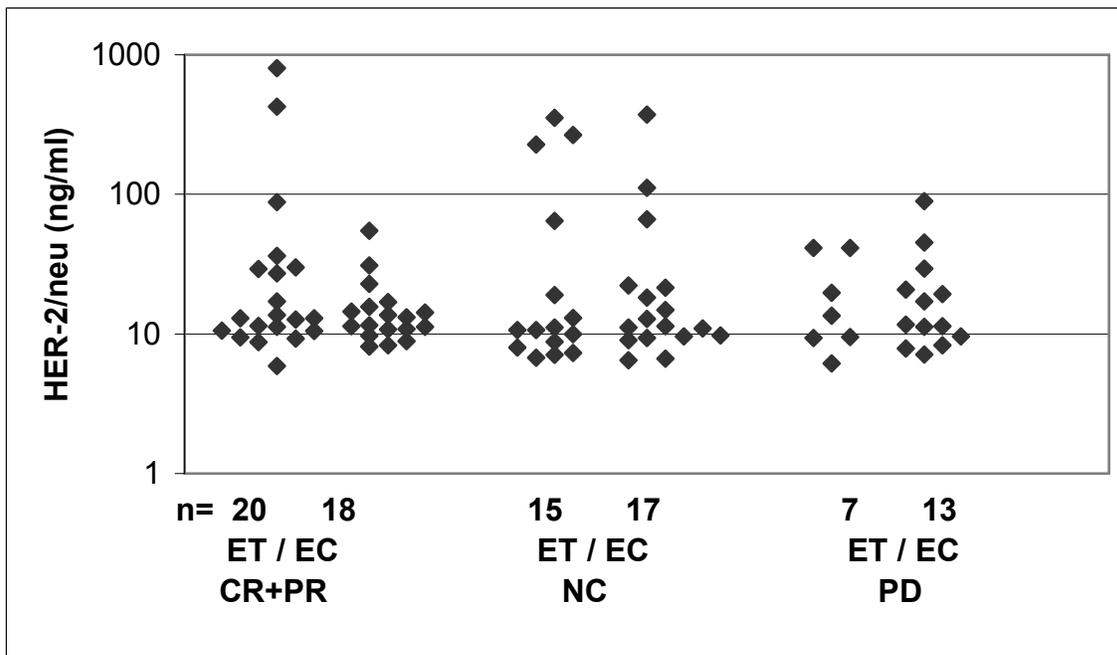
**Tabelle 11:** Verteilung der HER-2/*neu*-Werte innerhalb der verschiedenen Ansprechgruppen in den zwei Therapiearmen ( $p>0,05$ ).



**Abbildung 9:** Bestes Ansprechen in den beiden Therapiearmen bei HER-2/neu-Werten > 12 ng/ml.



**Abbildung 10:** Bestes Ansprechen in den beiden Therapiearmen bei HER-2/neu-Werten <= 12 ng/ml



**Abbildung 11:** Gleichmäßige Verteilung der HER-2/*neu*-Werte in den Ansprechgruppen in den zwei verschiedenen Therapiearmen.

Zahlenmäßig sprachen zwar weniger Patientinnen mit erhöhten HER-2/*neu*-Werten bei dem Grenzwert 17 ng/ml auf die Chemotherapie mit „EC“ an ( 3 vs. 8 Patientinnen) (Tab.12). Der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant

	ET		EC		(ng/ml)
	≤ 12	> 12	≤ 12	> 12	
CR+PR	8 (9%)	12 (13%)	9 (10%)	9 (10%)	
NC	9 (10%)	6 (7%)	9 (10%)	8 (9%)	
PD	3 (3%)	4 (4%)	7 (8%)	6 (7%)	

	ET		EC		(ng/ml)
	≤ 17	>17	≤17	>17	
CR+PR	12 (13%)	8 (9%)	15 (17%)	3 (3%)	
NC	10 (11%)	5 (6%)	11 (12%)	6 (7%)	
PD	4 (4%)	3 (4%)	7 (8%)	6 (7%)	

**Tabelle 12:** Verteilung der Patientinnen innerhalb der Ansprecharme in den 2 verschiedenen Therapiearmen in Abhängigkeit von erhöhtem oder niedrigem HER-2/*neu*-Wert bei zwei verschiedenen Grenzwerten. Weniger Patientinnen mit hohen HER-2/*neu*-Werten sprechen auf eine Therapie mit EC an ( $p>0,05$ ).

### 3.6. Progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben

#### 3.6.1. insgesamt

	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
<u>Progressionsfreies Intervall</u> (Monate)	<b>7,1</b>	7,7	5,1	0,5	23,2
<u>Gesamtüberleben</u> (Monate)	<b>16,2</b>	12,9	6,8	0,5	34,4

**Tabelle 13:** Progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben

#### 3.6.2. in Abhängigkeit von der Therapie

##### Progressionsfreies Intervall in beiden Therapiearmen

Bei der Berechnung des progressionsfreien Intervalls (PFI) und des Gesamtüberlebens (OS) nach Kaplan-Meier konnte mit dem Logrank-Test ( $p=0,39$  für PFI und  $p=0,78$  für OS) für die zwei verschiedenen Therapiearme kein Unterschied entdeckt werden.

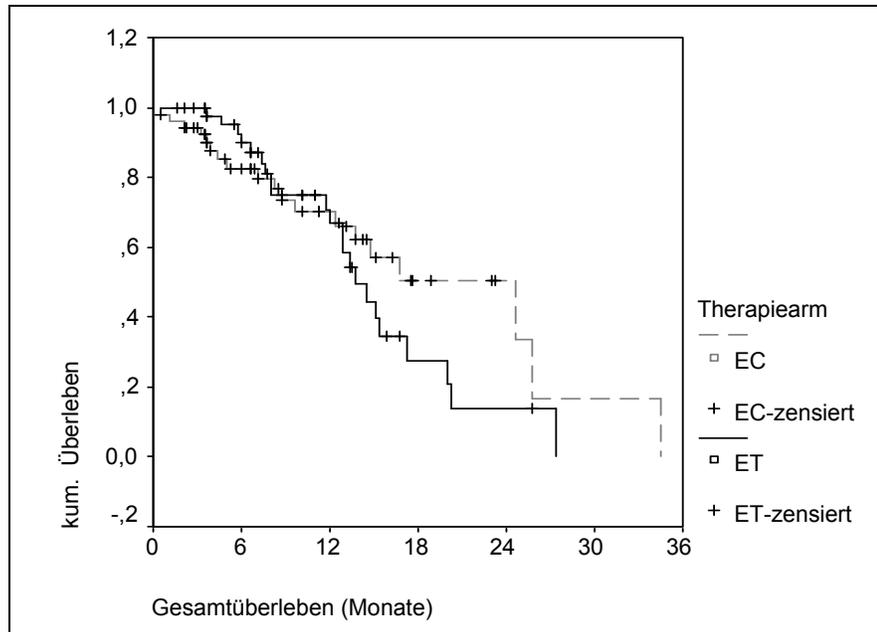
Das mediane progressionsfreie Intervall der 49 Patientinnen unter der Therapie „ET“ war 9 Monate (39 Wochen), das der 54 Patientinnen unter der Therapie „EC“ war 6,9 Monate (30 Wochen).

##### Gesamtüberleben in den beiden Therapiearmen

Das mediane Überleben der 49 Patientinnen unter der Therapie „ET“ war 13,8 Monate (60 Wochen), das der 54 Patientinnen unter der Therapie „EC“ war 24,6 Monate (107 Wochen).

Wie aus der unten abgebildeten Überlebenskurve nach Kaplan-Meier ersichtlich wird, erwies sich die Therapie mit ET im ersten Beobachtungsjahr als geringfügig wirkungsvoller, d.h. es verstarben weniger Patientinnen als unter der Therapie mit EC. Doch nach diesem Zeitraum

überschneiden sich die beiden Überlebenskurven und deutlich mehr Patientinnen versterben unter ET-Therapie (Abb.12). Dieser Befund entspricht auch den Daten der Gesamtauswertung der Studie (n=597 Patientinnen) [96].



**Abbildung 12:** Gesamtüberleben in den beiden Therapiearmen. Im ersten Beobachtungsjahr versterben weniger Patientinnen unter der Therapie mit EC. Nach diesem Zeitraum überschneiden sich die Überlebenskurven und mehr Patientinnen versterben unter der Therapie mit EC.

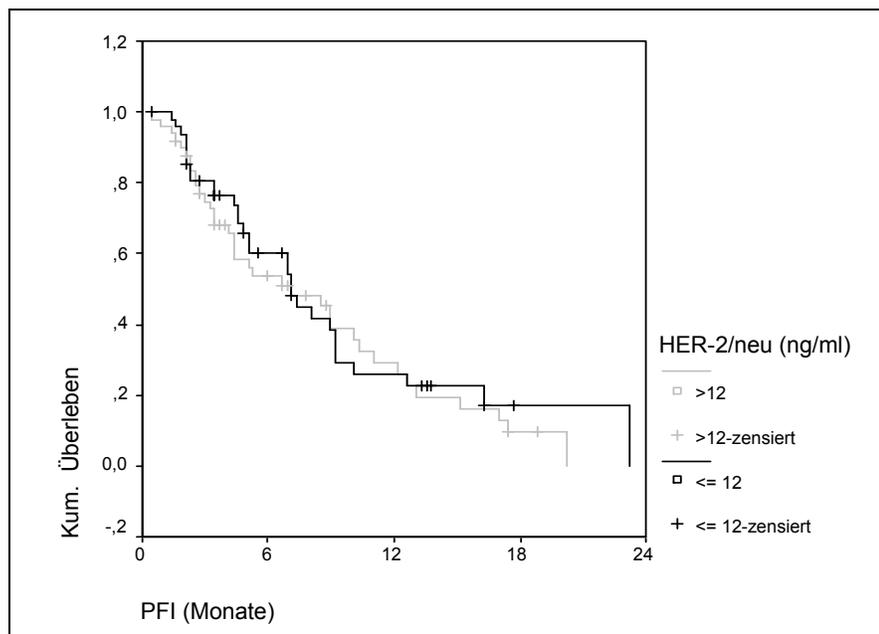
### 3.6.3. in Abhängigkeit von HER-2/*neu* vor der Therapie

Die Bestimmung des progressionsfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von HER-2/*neu* vor der Therapie wurde für verschiedene Grenzwerte vorgenommen.

Zum einen diente der durch das Normalkollektiv festgelegte Grenzwert von 12 ng/ml als Einteilungshilfe. Bei diesem Grenzwert lag ungefähr die eine Hälfte der Patientinnen unter und die andere Hälfte der Patientinnen über 12 ng/ml. Zum anderen erfolgte die Einteilung in Tertile und Quartile. Der obere Grenzwert bei der Einteilung in Tertile lag bei 17 ng/ml, das heißt, ein Drittel der Patientinnen hatte HER-2/*neu* Werte größer als 17 ng/ml. Der obere Grenzwert bei der Einteilung in Quartile lag bei 30 ng/ml, womit ein Viertel der Patientinnen Werte größer als 30 ng/ml hatten.

Das mediane progressionsfreie Intervall bei Patientinnen mit prätherapeutischen HER-2/*neu*-Werten  $\leq 12$  ng/ml lag bei 7,1 Monaten. Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten  $> 12$

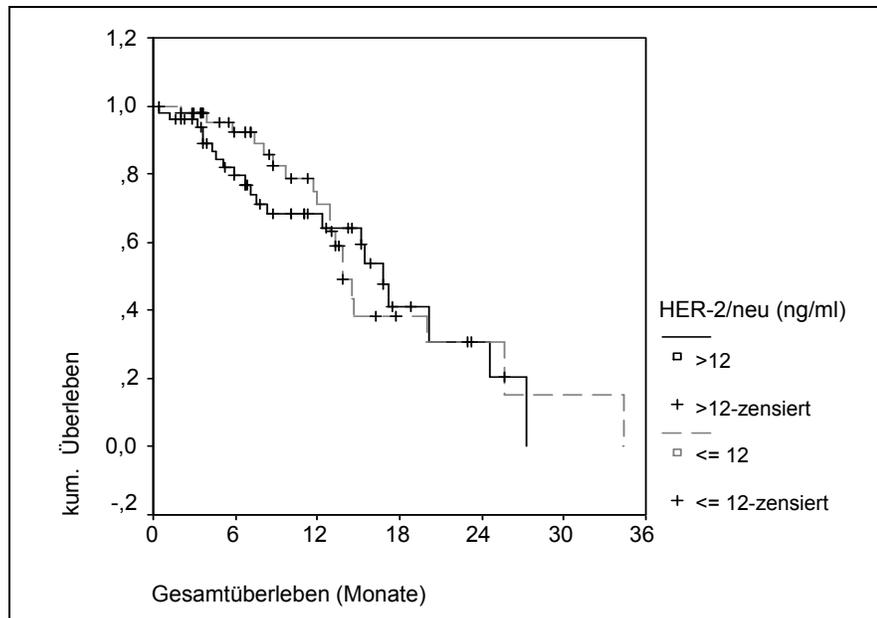
ng/ml hatten ebenfalls ein medianes progressionsfreies Intervall von 7,1 Monaten. Die 30 % der Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten > 17 ng/ml hatten mit 5,3 Monaten (vs. 8 Monaten bei Werten <= 17 ng/ml) ein etwas kürzeres medianes progressionsfreies Intervall. Die 25 % der Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten > 30 ng/ml hatten nur noch ein medianes progressionsfreies Intervall von 4,4 Monaten (vs. 8 Monaten bei Werten <= 30 ng/ml). Ein Trend zum kürzeren progressionsfreien Intervall bei hohen HER-2/*neu*-Werten ist also erkennbar, stellt sich aber nicht statistisch signifikant dar (Abb.13).



**Abbildung 13:** Progressionsfreies Intervall in Abhängigkeit vom HER-2/*neu*-Spiegel. Nahezu identischer Verlauf der beiden Kurven. Auch für andere Grenzwerte läßt sich nur ein Trend zu kürzerem progressionsfreien Intervall bei höheren HER-2/*neu*-Werten ermitteln ( $p > 0,05$ ).

Für das Gesamtüberleben läßt sich dieser Trend bei alleiniger Betrachtung der Mediane nicht verfolgen.

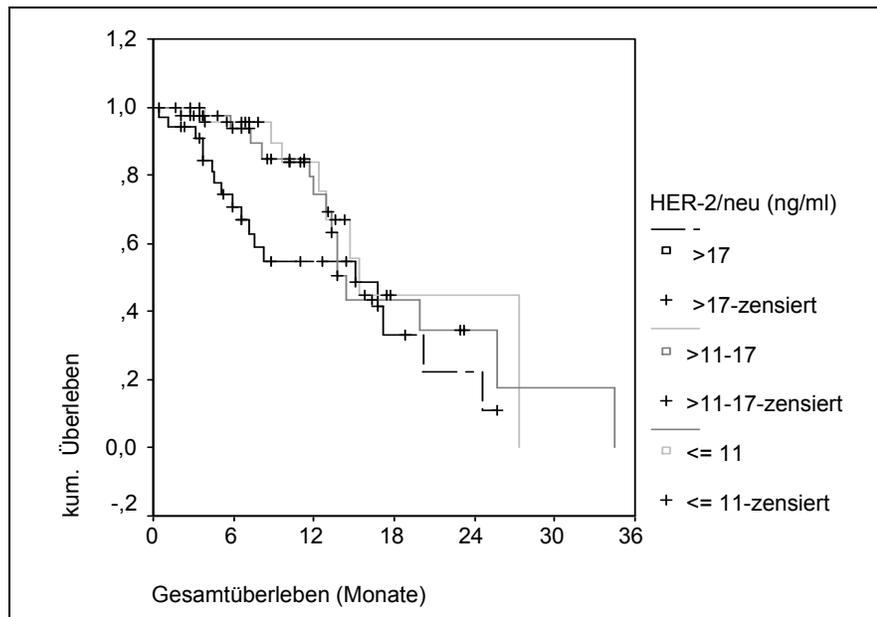
Patientinnen mit Werten > 12 ng/ml hatten ein medianes Gesamtüberleben von 16,8 Monaten (vs. 13,8 Monaten bei Werten <= 12 ng/ml) (Abb.14).



**Abbildung 14:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom HER-2/*neu*-Spiegel. Im ersten Beobachtungsjahr versterben mehr Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten größer 12 ng/ml. Bei Betrachtung der Mediane (kumulatives Überleben=0,5) für die beiden Kurven läßt sich dieser Trend nicht bestätigen ( $p>0,05$ ).

Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten  $> 17$  ng/ml lebten im Median 15,2 Monate (vs. 14,5 Monate bei Werten  $\leq 17$  ng/ml). Wie sich in der unten dargestellten Überlebenskurve nachvollziehen läßt, starben allerdings bis zum Zeitpunkt von ungefähr 12 Monaten vermehrt Patientinnen mit Werten größer 17 ng/ml als Patientinnen mit Werten kleiner gleich 17 ng/ml. Nach 12 Monaten waren 72 % der Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten  $> 17$  ng/ml verstorben im Gegensatz zu 41 % der Patientinnen mit Werten  $\leq 17$  ng/ml. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Unterschied zwischen dem oberen Drittel von Patientinnen in Bezug auf HER-2/*neu*-Werte und den unteren zwei Dritteln statistisch signifikant (Test nach Breslow:  $p=0,02$ ). Nach etwas mehr als einem Jahr kreuzen sich allerdings die drei Kurven und ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen HER-2/*neu* und Gesamtüberleben für den gesamten Beobachtungszeitraum läßt sich nicht beobachten (Logrank-Test:  $p>0,05$ ) (Abb.15). Für Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten  $> 30$  ng/ml lag das mediane Gesamtüberleben bei 15,2 Monaten (vs. 16,8 Monate bei Werten  $\leq 30$  ng/ml). Ein statistisch signifikanter Unterschied läßt sich auch hier nicht ermitteln.

Berücksichtigt man, daß zum Zeitpunkt der Metastasierung keine Heilung mehr möglich ist, findet sich bei Betrachtung der Überlebenskurven im ersten Beobachtungsjahr ein Hinweis auf ein kürzeres Gesamtüberleben bei höheren HER-2/*neu*-Werten.



**Abbildung 15:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom HER-2/*neu*-Spiegel. Deutlich mehr Patientinnen mit HER-2/*neu*-Werten größer 17 ng/ml versterben im ersten Beobachtungsjahr. Im Testverfahren nach Breslow stellt sich der Unterschied unter Gewichtung der vorderen Kurvenabschnitte signifikant dar ( $p=0,02$ ); bei Betrachtung des gesamten Beobachtungszeitraums im Logrank-Test läßt sich kein Unterschied zwischen den Überlebenskurven ermitteln ( $p>0,05$ )

### 3.6.4. in Abhängigkeit von anderen Prognoseparametern

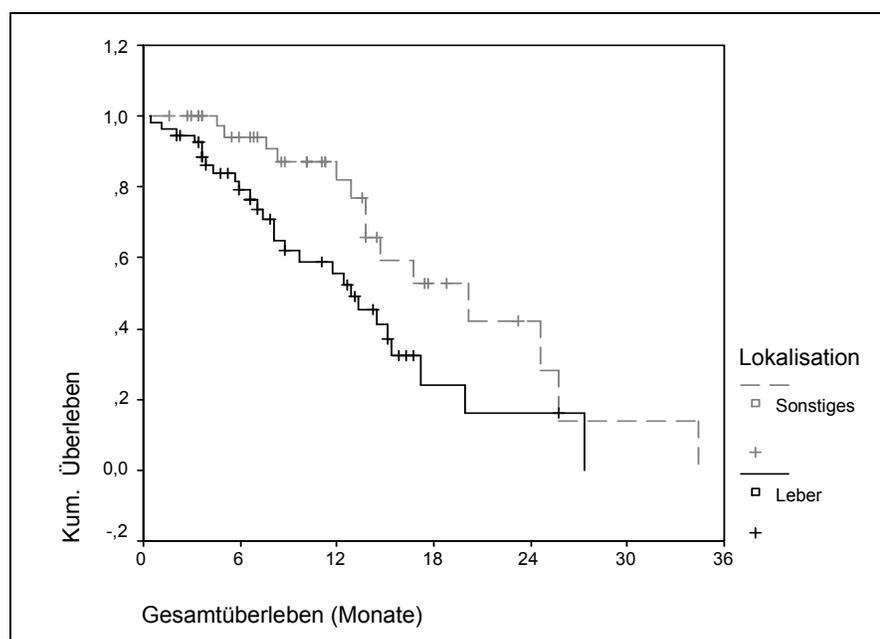
		Progressionsfreies Intervall	Gesamtüberleben
Nodalstatus	(N0/N1)	NS	NS
T-Stadium	(T1-T4)	NS	NS
Grading	(G1-G3)	NS	NS
Östrogenrezeptor	(pos/neg)	NS	NS

**Tabelle 14:** Progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von anderen Prognoseparametern. Keines der am Primärtumor bestimmten Prognoseparameter erlaubt zum Zeitpunkt der Metastasierung einen Rückschluß auf Dauer des progressionsfreies Intervalls und Gesamtüberlebens.

### 3.6.5. in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisierung

Das progressionsfreie Intervall war für Patientinnen mit Lebermetastasen mit einem Median von 5,1 Monaten deutlich kürzer als für Patientinnen mit Lungen- (9 Monate) oder anderen Metastasen, wie z.B. Lymphknotenmetastasen (9,2 Monate). Allerdings war der Unterschied nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

Allerdings ergab sich für das Gesamtüberleben ein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit Lebermetastasen, die ein medianes Gesamtüberleben von 12,9 Monaten hatten, verglichen mit dem medianen Gesamtüberleben von 20,3 Monaten für Patientinnen mit anderen Metastasenlokalisationen ( $p = 0,017$ ) (Abb.16).



**Abbildung 16:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisation. Das mediane Überleben von Patientinnen mit Lebermetastasen war kürzer als für Patientinnen mit anderen Metastasenlokalisationen ( $p=0,017$ ).

### 3.7. HER-2/*neu* und Metastasierung

#### HER-2/*neu* Konzentrationen in Abhängigkeit von der Anzahl der Metastasenlokalisationen

Wie aus der unten dargestellten Tabelle ersichtlich wird, hängt der HER-2/*neu*-Wert in diesem Patientinnenkollektiv nicht von der Anzahl der Metastasenlokalisationen ab (Tab.15). Eine große Tumorlast hat in dieser Darstellung keinen Einfluß auf die Konzentration von HER-2/*neu* im Serum. Auch wenn man die Werte von HER-2/*neu* für zwei und mehr

Metastasenlokalisationen zusammen betrachtet, ergibt sich ein Median von 12,8 ng/ml (MW= 49,7 ng/ml; SD= 16,7 ng/ml).

Anzahl der Metastasenlokalisationen	Anzahl der Patientinnen	Median von HER-2/ <i>neu</i> (ng/ml)	Minimum (ng/ml)	Maximum (ng/ml)
1	35	13.0	6.1	352.5
2	33	13.0	6.5	372.2
3	17	12.7	5.9	803.6
4	4	12.8	7.9	36.3
5	4	10.8	9.6	426.3

**Tabelle 15:** HER-2/*neu*-Konzentration in Abhängigkeit von der Anzahl der Metastasenlokalisationen. Eine große Tumorlast hat keinen Einfluß auf die HER-2/*neu*-Konzentration.

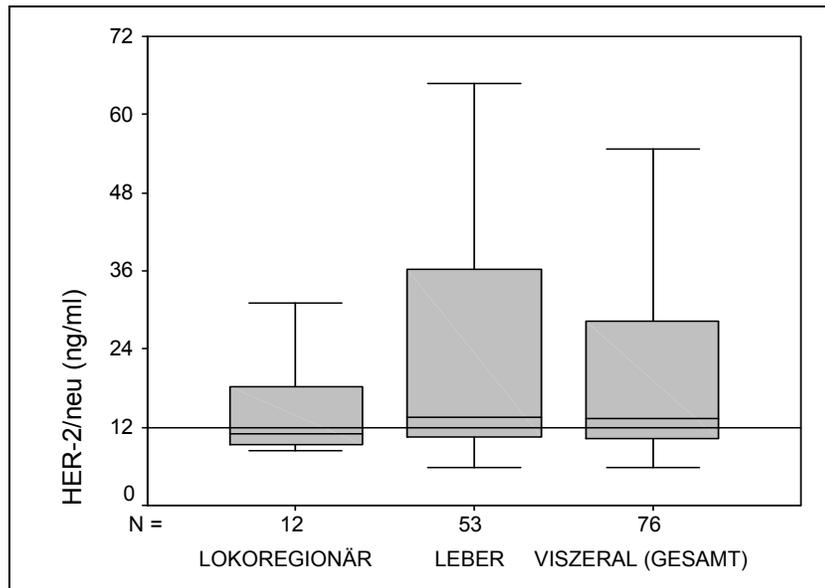
#### HER-2/*neu*-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisation

Um die Patientinnen den verschiedenen Metastasenlokalisationen zuzuordnen, wurden Patientinnen als viszeral metastasiert betrachtet, wenn sie eine Metastasierung in Leber, Lunge, Pleura oder Peritoneum hatten. Sobald Patientinnen viszeral metastasiert waren, wurde keine andere Metastasierung mehr für die Einteilung berücksichtigt. Patientinnen wurden nur dann als lokoregionär metastasiert eingestuft, wenn sie keine Eingeweidemetastasen hatten. Die Metastasierung in die Leber wurde exemplarisch als viszerale Metastasierung herausgegriffen, da ein Großteil der Patientinnen Lebermetastasen hatte (55,8 %).

Bei lokoregionärer Metastasierung hatten die Patientinnen mediane HER-2/*neu*-Konzentrationen von 11,1 ng/ml (Min.= 8,3 ng/ml; Max.= 32,1 ng/ml). Dagegen zeigten Patientinnen mit viszeraler Metastasierung mit 14,4 ng/ml wesentliche höhere mediane HER-2/*neu*-Konzentrationen (Min.= 5,9 ng/ml; Max.= 803,6 ng/ml). Bei Betrachtung allein der

Lebermetastasen konnten sogar noch höhere mediane Werte von HER-2/*neu* (14,8 ng/ml) berechnet werden (Min.= 5,9 ng/ml; Max.= 803,6 ng/ml).

Damit unterschieden sich viszerale und lokoregionäre Metastasierung im Mann-Whitney-Test signifikant voneinander ( $p=0,044$ ) (Abb.17).



**Abbildung 17:** Verteilung der HER-2/*neu*-Werte in Abhängigkeit von der Metastasenlokalisation. Patientinnen mit viszeraler Metastasierung bzw. Lebermetastasen zeigten höhere HER-2/*neu*-Werte als Patientinnen mit lokoregionärer Metastasierung ( $p=0,044$ ).

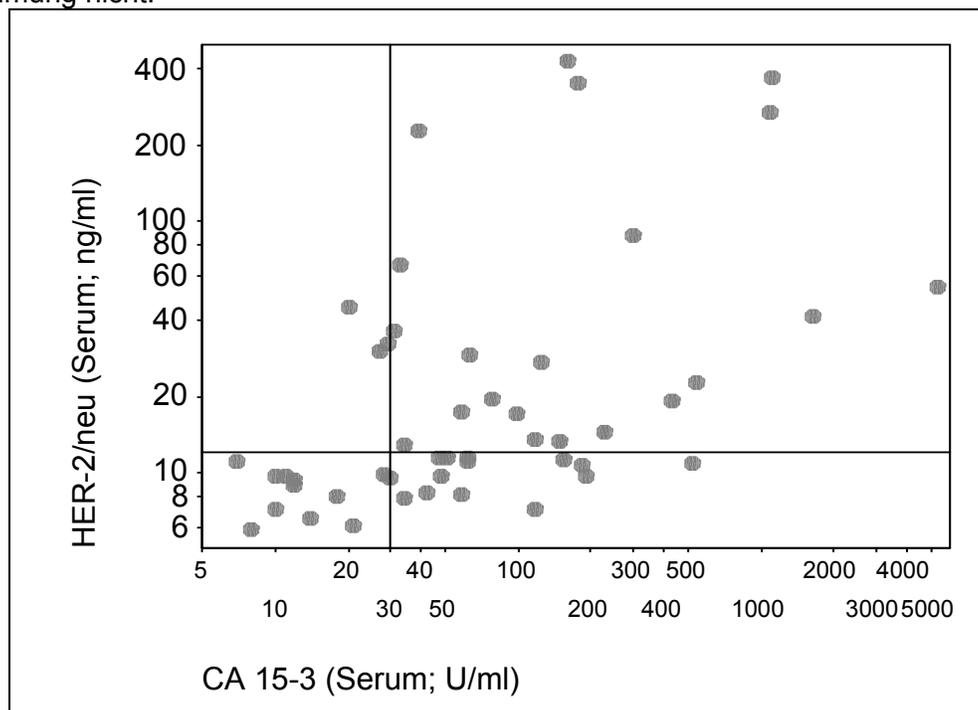
### 3.8. Korrelation von HER-2/*neu*-Verlaufskontrollen mit dem Tumormarker CA 15-3

Von 49 Patientinnen lagen CA 15-3 Werte vor. 12 Patientinnen zeigten CA 15-3-Werte kleiner 30 U/ml und gleichzeitig HER-2/*neu*-Werte kleiner 12 ng/ml. 21 Patientinnen hatten CA 15-3-Werte größer 30 U/ml und gleichzeitig HER-2/*neu*-Werte größer 12 ng/ml. Die restlichen 16 Patientinnen lagen in der einen Bestimmung unter und in der anderen über dem Grenzwert. Somit konnte eine signifikante Korrelation zwischen HER-2/*neu* und CA 15-3 nachgewiesen werden ( $p=0,012$ ) (Tab.16+Abb.18).

	CA 15-3 (Serum)		
	< 30	>= 30	N

HER-2/ <i>neu</i> (Serum)	< 12	12	13	24
	>= 12	3	21	25
	n	15	34	49

**Tabelle 16:** Korrelation zwischen CA 15-3 und HER-2/*neu* ( $p=0,012$ ). Bei 33 von 49 Patientinnen waren CA 15-3- und HER-2/*neu*-Werte gleichsinnig unter bzw. über den jeweiligen Grenzwerten. Bei 16 von 49 Patientinnen korrelierten CA 15-3- und HER-2/*neu*-Bestimmung nicht.



**Abbildung 18:** Darstellung der CA 15-3- und der korrespondierenden HER-2/*neu*-Werte. Die jeweiligen Grenzwerte (12 ng/ml für HER-2/*neu* und 30 U/ml für CA 15-3) sind zur Orientierung eingezeichnet.

### CA 15-3-Verlaufskontrollen

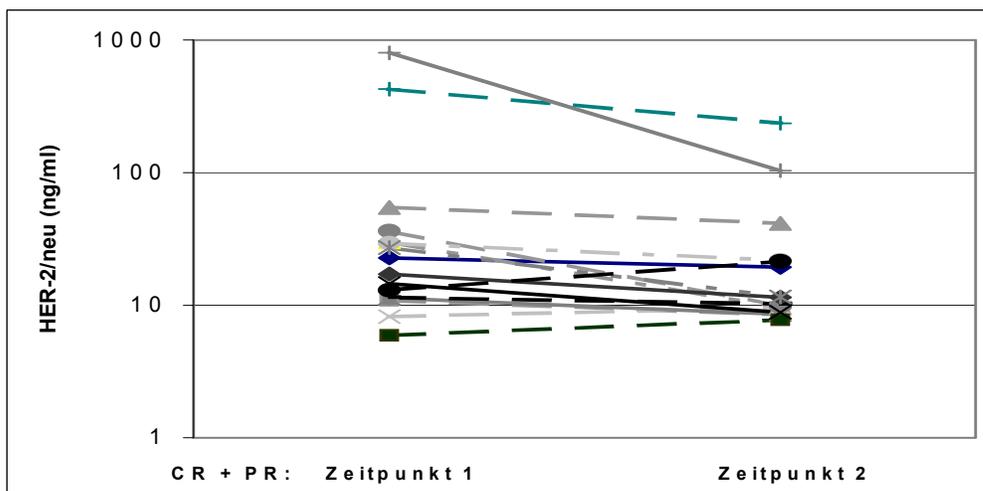
Vor Beginn der Therapie hatten 34 von 49 Patientinnen erhöhte CA 15-3-Spiegel im Serum (Normalbereich bis 30 U/ml). Das entspricht 69,4 % der Patientinnen. Betrachtet man die Verlaufswerte des Tumormarkers CA 15-3, so sieht man, daß der Median der Werte mit Behandlungsdauer abnahm ( $58 \rightarrow 38 \rightarrow 30,5$  U/ml). Ebenfalls die Mittelwerte sanken ab ( $279,6 \rightarrow 206,3 \rightarrow 112,1$  U/ml) (Tab.17).

	CA 15-3 vor der Therapie	CA 15-3 zum Zeitpunkt 1	CA 15-3 zum Zeitpunkt 2
Anzahl	49	37	32
> 30 U/ml (%)	69,4 (%)	64,9 (%)	50 (%)
Median	58,0	38,0	30,5
Minimum	7,0	8,0	8,0
Maximum	5355,0	4575,0	1000,0

**Tabelle 17:** Tumormarker CA 15-3 vor Beginn der Therapie (U/ml), nach 3 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 1), nach 6 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 2).  
Höhe des Abfalls von HER-2/neu oder CA 15-3

Bei Patientinnen mit kompletter oder partieller Remission lag der mediane Abfall der HER-2/neu-Werte nach 3 Zyklen Chemotherapie bei 5,7 ng/ml (von 17,1 ng/ml auf 11,4 ng/ml). Dabei gab es einen maximalen Abfall von 700 ng/ml (Ausgangswert: 803,6 ng/ml) und als Minimum einen Anstieg von 8,45 ng/ml. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen dem Anstieg von 32,6 ng/ml und dem Abfall von 155,6 ng/ml (Abb.19).

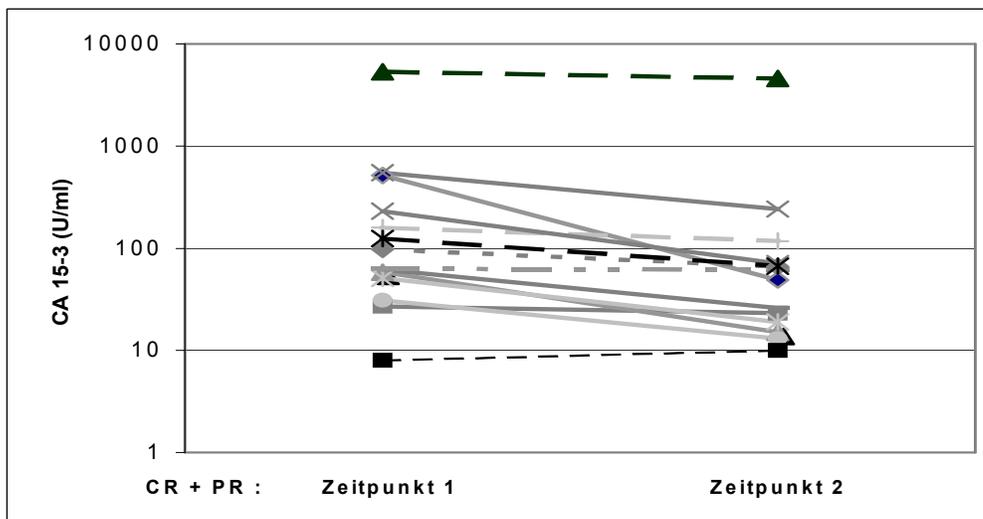
Vor Beginn der Therapie zeigten 69% (11/16) der Patientinnen mit kompletter und partieller Remission HER-2/neu Werte größer 12 ng/ml. Nach 3 Zyklen Chemotherapie hatten noch 38% (6/16) der Patientinnen erhöhte Werte. Bei 81% der Patientinnen fielen die HER-2/neu-Werte während der Therapie ab. Ein Abfall von HER-2/neu war mit dem Therapieansprechen assoziiert ( $p=0,006$ , Wilcoxon-Test).



**Abbildung 19:** Veränderung des HER-2/*neu*-Wertes im Therapieverlauf bei kompletter und partieller Remission. Bei 81% der Patientinnen mit kompletter und partieller Remission fielen die HER-2/*neu*-Werte während der Therapie ab ( $p=0,006$ ).

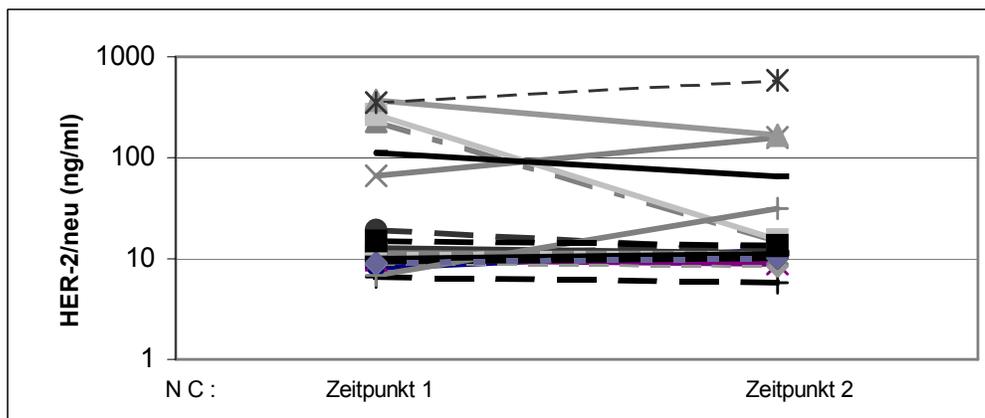
Der mediane Abfall von CA 15-3-Werten bei Patientinnen mit kompletter oder partieller Remission nach 3 Zyklen Chemotherapie lag im Median bei 9,14 U/ml (von 98 auf 49 U/ml). Dabei gab es einen maximalen Abfall von 780 U/ml (Ausgangswert: 1096 U/ml) und als Minimum einen Anstieg von 2 U/ml. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen dem Abfall von 9,1 bis zu dem Abfall von 272,9 U/ml (Abb.20).

Vor Beginn der Therapie zeigten 85,8% (12/14) der Patientinnen mit kompletter und partieller Remission CA 15-3-Werte größer 30 U/ml. Nach 3 Zyklen Chemotherapie hatten noch 50% (7/14) der Patientinnen erhöhte Werte. 86 % der Patientinnen mit kompletter oder partieller Remission zeigten einen Abfall von CA 15-3 ( $p=0,002$ , Wilcoxon-Test).

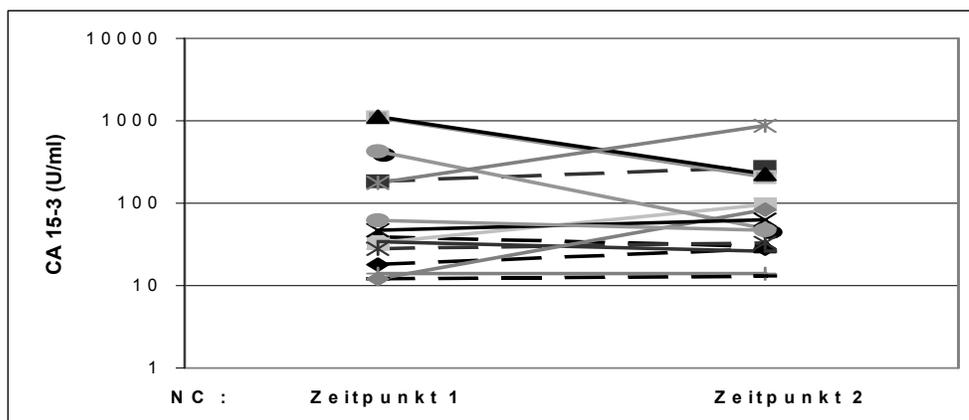


**Abbildung 20:** Veränderung des CA 15-3-Wertes im Therapieverlauf bei kompletter und partieller Remission. Bei 86% der Patientinnen mit kompletter und partieller Remission fielen die CA 15-3-Werte während der Therapie ab ( $p=0,002$ ).

Betrachtet man Patientinnen mit „no change“, so zeigt sich, daß die HER-2/*neu*-Werte bei 25 % der Patientinnen im Therapieverlauf ansteigen (5/20 Patientinnen), bei 25 % der Patientinnen abfallen (5/25 Patientinnen) und sich bei der Hälfte der Patientinnen nicht verändern (10/20 Patientinnen) (Abb.21). Eine ähnliche Beobachtung kann man für CA 15-3 machen. Bei 40% der Patientinnen zeigt sich ein Anstieg der CA 15-3-Werte (6/15 Patientinnen), bei 47% der Patientinnen ein Abfall (7/15 Patientinnen) und bei 13% der Patientinnen zeigt sich keine Veränderung der CA 15-3-Werte (2/15 Patientinnen) (Abb.22).

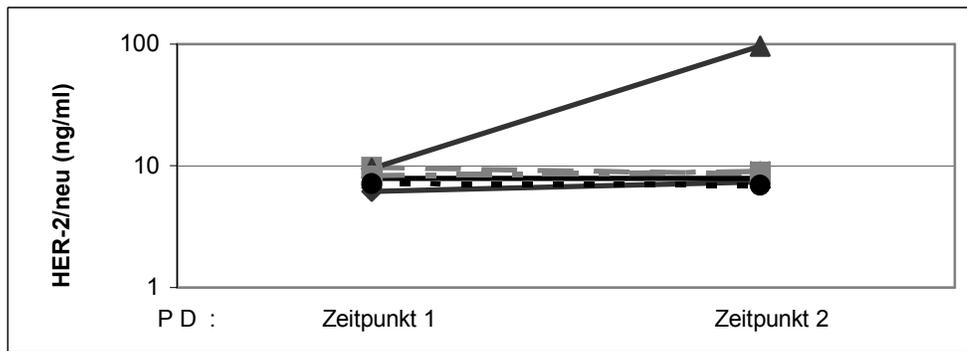


**Abbildung 21:** Veränderung des HER-2/*neu*-Wertes im Therapieverlauf bei Patientinnen mit "no-change".

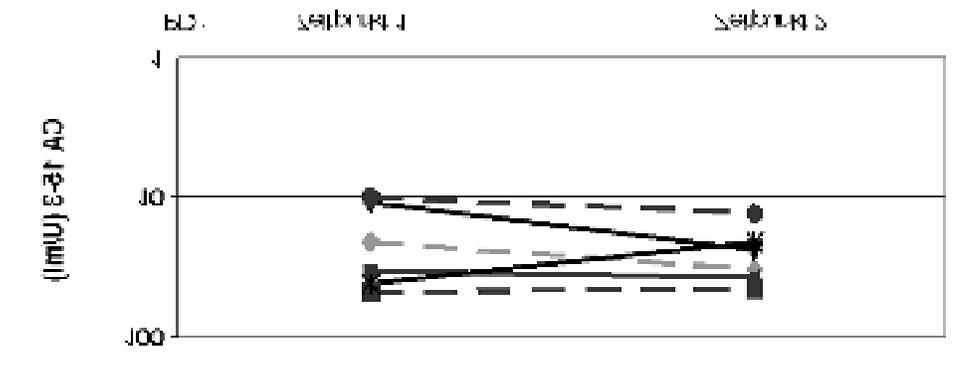


**Abbildung 22:** Veränderung des CA 15-3-Wertes im Therapieverlauf bei Patientinnen mit "no-change".

Die Veränderung von HER-2/neu und CA 15-3 unter der Therapie ist von nur 6 Patientinnen mit Progression dokumentiert, so daß sich keine signifikanten Hinweise auf eine Veränderung des Tumormarkers bei Progression ergeben (Abb.23+24).



**Abbildung 23:** Veränderung des HER-2/neu-Wertes im Therapieverlauf bei Progression.



**Abbildung 24:** Veränderung des CA 15-3-Wertes im Therapieverlauf bei Progression. Im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben zeigte sich, daß das Absinken des HER-2/neu-Wertes nach 3 Zyklen Chemotherapie eine komplette oder partielle Remission anzeigen kann ( $p=0.006$ ).

Damit kommt dem HER-2/neu-Wert eine Bedeutung als Tumormarker entsprechend dem etablierten Tumormarker CA 15-3 zu ( $p=0.002$  für den angegebenen Zeitraum).

Im Gegensatz dazu erlaubt die Veränderung des HER-2/neu-Wertes von Beginn der Therapie bis zum Zeitpunkt 2 (= nach 6 Zyklen Chemotherapie) oder vom Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 nicht, eine Aussage darüber zu machen, ob eine Remission eingetreten ist oder nicht (Tab.18).

Anzahl p-Wert

HER-2/ <i>neu</i> vor der Therapie – HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 1	16	<b>0.006</b>
CA 15-3 vor der Therapie – CA 15-3 zum Zeitpunkt 1	14	<b>0.002</b>
HER-2/ <i>neu</i> vor der Therapie – HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 2	16	NS
CA 15-3 vor der Therapie – CA 15-3 zum Zeitpunkt 2	14	<b>0.012</b>
HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 1 – HER-2/ <i>neu</i> zum Zeitpunkt 2	16	NS
CA 15-3 zum Zeitpunkt 1 – CA 15-3 zum Zeitpunkt 2	14	NS

Zeitpunkt 1 = 3 Zyklen Chemotherapie;      Zeitpunkt 2 = 6 Zyklen Chemotherapie

**Tabelle 18:** Verlaufskontrollen von HER-2/*neu* und CA 15-3 bei Patientinnen mit kompletter oder partieller Remission. Ein Absinken des HER-2/*neu*- und des CA 15-3-Wertes nach 3 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 1) zeigt eine komplette oder partielle Remission an ( $p=0,006$  bzw.  $p=0,002$ ). Ebenso zeigt das Absinken des CA 15-3-Wertes nach 6 Zyklen Chemotherapie (Zeitpunkt 2) eine komplette oder partielle Remission an ( $p=0,012$ ).

---

## 4. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung stellt eine retrospektive klinische Studie dar, welche neben dem methodischen Vergleich zweier Analyseverfahren die Bedeutung des Onkogens *HER-2/neu* für den Verlauf der metastasierten Mammakarzinomerkrankung und das Therapieansprechen auf die palliative Chemotherapie untersucht.

Dazu wurde *HER-2/neu* im Serum vor Beginn der Chemotherapie bei 103 Patientinnen mittels ELISA nachgewiesen.

Bei 29 Patientinnen wurden auch die formalinfixierten Paraffinschnitte des primären Mammakarzinomgewebes untersucht.

### 4.1. Wahl des Grenzwertes

Die in der Literatur angegebenen Grenzwerte im ELISA differieren stark. Viele Untersuchungen wurden mit nicht standardisierten ELISAs durchgeführt. Außerdem gibt es noch keinen einheitlich anerkannten Grenzwert für das Proto-Onkogen *HER-2/neu*. Zur Vergleichbarkeit mehrerer Studienergebnisse scheint jedoch die Verwendung eines standardisierten Assays und eines einheitlichen cut-off-Levels notwendig. Der quantitative Vergleich der Befunde erweist sich wegen der unterschiedlichen Meßprinzipien und Bezugssysteme als nicht sinnvoll. Grenzwerte werden angegeben in femtomol/ml ([6; 55; 94]) und in Units/ml ([11; 40-44; 87]). Allerdings sind auch die Konzentrationseinheiten untereinander nicht zu vergleichen, da die Werte durch Verwendung unterschiedlicher Antikörper stark differieren. Serum wurde meist auch von gesunden Kontrollpersonen (Minimum: n=10, Maximum: n=79) oder von Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen gewonnen und zur Bestimmung des Grenzwertes auf den Gehalt an *HER-2/neu*-Protein untersucht. Dabei wurde fast in allen Studien darauf geachtet, daß bei der Wahl des Grenzwertes Gesunde -wenn möglich- keine Werte über dem gewählten cut-off Level aufwiesen. Meist wurde der Mittelwert der gesunden Personen plus die zwei- bis dreifache Standardabweichung als Grenzwert festgelegt.

Die Veröffentlichungen mit dem in dieser Studie verwendeten ELISA von Oncogene Science Diagnostics sind rar. Zwei Studien geben einen Grenzwert von 15 ng/ml an [97; 98].

In unserer Studie wurde der *HER-2/neu*-Wert bei 30 gesunden Blutspenderinnen bestimmt, die älter als 45 Jahre sein sollten. In keinem Fall lagen die Werte über 12 ng/ml (Maximum=

---

11,12 ng/ml). Es ist davon auszugehen, daß der HER-2/*neu*-Wert bei gesunden altersentsprechenden Frauen (>45 Jahre) diesen Maximalwert nicht überschreitet, da sich die Werte der Kontrollpersonen zwischen dem Bereich von 5,5 und 11,12 ng/ml bewegten. Deswegen definierten wir 12 ng/ml als den Grenzwert. Wäre zur Berechnung des Grenzwertes der Mittelwert des Kontrollkollektivs plus die 2- oder 3fache Standardabweichung gewählt worden, läge der cut-off Level entweder bei 11,58 oder bei 12,99 ng/ml, nahe des definierten Grenzwertes von 12 ng/ml. Der Median der Patientinnengruppe bei 12,73 ng/ml. Somit hatten 51,5% der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom erhöhte Werte (>12 ng/ml). Auch durch die Wahl anderer Grenzwerte (17 und 30 ng/ml) zur Optimierung des Grenzwertes konnten keine signifikanten Schlußfolgerungen in Bezug auf Prognose und Therapieansprechen gezogen werden.

In anderen Studien wurden erhöhte Werte bei metastasiertem Mammakarzinom am niedrigsten gemessen in 19,3% der Fälle ([43]), etwas höher in 34% der Fälle ([44]), 38,8% ([6]) und 40 % der Fälle ([41]), und am höchsten in 68% der Fälle ([11]) und 64% der Fälle nur unter Berücksichtigung der Lungen- oder Lebermetastasierung ([42]).

Es konnten jedoch alle Studien zeigen, daß HER-2/*neu*-Werte in der metastasierten Situation deutlich über den Werten bei primärer Mammakarzinomerkrankung liegen.

#### **4.2. Vergleich zwischen Immunhistochemie und ELISA**

Die ELISA-Technik rückt immer stärker in das Zentrum medizinischer Untersuchungsmethoden. Diese auf einem enzymimmunologischen Prinzip beruhende Methode hat sich in der medizinischen Diagnostik etabliert. Der Nachweis der extrazellulären Domäne von HER-2/*neu* im Serum wird mit Hilfe monoklonaler Antikörper im sog. „Sandwich Assay“ möglich. Bis jetzt konnte noch kein natürlicher Ligand für HER-2/*neu* ermittelt werden [12; 51]. Die monoklonalen Antikörper können somit im Bereich der extrazellulären Domäne binden, ohne von einer eventuell vorliegenden Ligandenbindung beeinträchtigt zu werden.

In den meisten Studien wurde die HER-2/*neu*-Überexpression mittels immunhistochemischer Untersuchung des Primärtumors bestimmt. Obwohl die Methode durch zahlreiche mögliche Störgrößen und die Benutzung verschiedener Antikörper und Auswertverfahren nicht standardisiert ist [79], stellt sie doch das etablierteste Verfahren der HER-2/*neu*-Bestimmung dar.

---

Da Gewebeproben von Metastasen teilweise schwer zu gewinnen sind, greift man auch in der metastasierten Situation auf die Rezeptorbestimmung am Primärtumor zurück. Dabei berücksichtigt man allerdings nicht, daß an der Tumorzelle im Verlauf der Erkrankung biologische Veränderungen stattgefunden haben können. Deswegen stellt der ELISA als leicht durchzuführende Methode im Serum eine vielversprechende Alternative dar, die genauere Informationen über den HER-2/*neu*-Status zum Zeitpunkt der Metastasierung liefern kann. Vor dem Hintergrund des intensiv untersuchten neuen Therapieansatzes bei metastasiertem Mammakarzinom durch rekombinante monoklonale Antikörper [53; 66; 68; 69; 98; 99], der sich in klinischen Studien schon bewährt hat [67], stellt sich die Frage, ob die HER-2/*neu*-Bestimmung im Serum nicht als Grundlage für den Einschluß in klinische Studien mit dem als Medikament entwickelten HER-2/*neu*-Antikörper Herceptin® gelten kann [70; 100].

Für n=29 Patientinnen, die in der Universitäts-Frauenklinik operiert wurden, wird der Vergleich der Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden (ELISA und IHC) durchgeführt. Die immunhistochemische Untersuchung des Primärtumors erfolgte an Paraffinschnitten mit dem CB-11 Antikörper von Novocastra Laboratories®, UK. Es wurde die Anfärbung der Zellmembranen nach dem System von Remmele und Stegner ausgewertet [95]. In der IHC wurde der cut-off Level willkürlich bei 9 festgelegt. Damit hatten 31% (9/29) der Patientinnen eine erhöhte HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor, was sich mit der in der Literatur angegebenen HER-2/*neu*-Überexpression zwischen 10 und 40% im Primärtumor deckt.

Allerdings hatten alle untersuchten Patientinnen Metastasen. Bei solchen Patientinnen wurden in anderen Studien höhere Werte der HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor (50% der Fälle) ermittelt [101]. Die 29 untersuchten Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Metastasierung in 41 % der Fälle (12/29) erhöhte Werte von HER-2/*neu* im Serum. Immunhistochemie und ELISA stimmten in 83% der Fälle überein (p= 0,018). Allerdings hatten 4 Patientinnen erhöhte Werte im Serum, obwohl sie im Primärtumor keine HER-2/*neu*-Überexpression zeigten und 1 Patientin hatte bei hoher HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor einen niedrigen HER-2/*neu*-Wert im Serum. In einer Untersuchung von Fehm et al. bei metastasiertem Mammakarzinom zeigten sogar 35 % der Patientinnen eine Veränderung des HER-2/*neu*-Status zum Zeitpunkt der Metastasierung verglichen mit dem Serumwert zum Zeitpunkt der Primärdiagnose [6].

Die Frage ist, ob die Tumorzelle im Verlauf der Erkrankung modifiziert und HER-2/*neu*-positive Zellklone vermehrt metastasieren oder ob die HER-2/*neu*-Werte bei 4 Patientinnen

---

erhöht waren, weil sie eine hohe Tumorlast (viele befallene Organsysteme) hatten. Dazu untersuchten wir die HER-2/*neu*-Werte in Abhängigkeit von der Anzahl der Metastasenlokalisationen. Wir konnten allerdings keinen Zusammenhang zwischen Anzahl der Metastasenlokalisationen und Höhe von HER-2/*neu* im Serum erkennen. Allerdings kann dieses Ergebnis auch verfälscht sein durch die ungenügende Dokumentation von Metastasenlokalisationen bzw. die unzureichende Diagnostik aller bei den Patientinnen vorhandenen Metastasen. Das Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen von Colomer et al., die bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Anzahl der Metastasen und Höhe von HER-2/*neu* im Serum nachweisen konnten [102].

Parallel zu den Untersuchungen am Serum fand in Los Angeles, USA, im Labor von Dennis J. Slamon die immunhistochemische Untersuchung der Primärtumore der in der Studie behandelten Patientinnen statt. 188 Tumorblöcke konnten dort auf die HER-2/*neu*-Überexpression untersucht werden. Gearbeitet wurde mit einem polyklonalen Antikörper R60, der in diesem Labor entwickelt worden war. Die Befunde wurden vier Kategorien zugeteilt (0, 1fach positiv, 2fach positiv und 3fach positiv). Als HER-2/*neu*-negativ wurden die Befunde „0“ und „1“ gewertet, als HER-2/*neu*-positiv die Befunde „2“ und „3“. 46% der Patientinnen zeigten eine HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor (2+ und 3+), was sich mit den im Serum bestimmten 51,5% nahezu deckt.

### **4.3. Prognostischer Wert von *HER-2/neu***

In dieser Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den HER-2/*neu*-Werten und Alter, Histologie-Typ, der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus, dem Grading und dem Östrogenrezeptorstatus aufgezeigt werden ( $p > 0,05$ ).

In zahlreichen Studien wird die Korrelation zwischen HER-2/*neu*-Status und Alter der Patientin, Histologie-Typ, Grading und Tumorgröße kontrovers diskutiert [36; 40; 54; 94].

Viele Studien fanden keine Korrelation zwischen Alter der Patientinnen und HER-2/*neu*-Status [103; 104]. Dieses Ergebnis überrascht umso mehr, da HER-2/*neu*-indirekt mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptor korreliert [38; 54] und diese wiederum mit dem Alter korrelieren [104; 105].

Die meisten Studien fanden keine Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem HER-2/*neu*-Status [40; 103; 104]. Trotzdem war die HER-2/*neu*-Überexpression in einigen Studien mit größeren Tumoren assoziiert [54].

---

Auch die Frage des Zusammenhangs zwischen Nodalstatus und HER-2/*neu*-Überexpression wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich beantwortet. Obwohl in den meisten Studien kein Zusammenhang gesehen wurde [103; 105], beschrieben zahlreiche Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen Nodalstatus und HER-2/*neu* [54; 94].

Die HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor konnte signifikant mit dem Auftreten von Metastasen korreliert werden [11; 101]. Der Zusammenhang zwischen HER-2/*neu*-Status und Lokalisation der Metastasen ist nicht vollständig geklärt. Während Molina et al. signifikant höhere HER-2/*neu*-Werte für Patientinnen mit Leber- und Lungenmetastasen fanden [42] und erhöhte HER-2/*neu*-Werte auch als Marker sahen, die das Auftreten von Metastasen voraussagen können [90], konnten Fehm et al. keinen Zusammenhang zwischen Metastasenlokalisierung und HER-2/*neu*-Wert herstellen, wobei in jener Studie Patientinnen mit Knochenmetastasen die höchsten HER-2/*neu*-Werte zeigten [6].

In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientinnenkollektiv hatten Patientinnen mit viszerale Metastasen deutlich höhere HER-2/*neu*-Konzentrationen im Serum als Patientinnen mit lokoregionärer Metastasierung ( $p=0,044$ ). Knochenmetastasen konnten als alleinige Metastasenlokalisierung nicht beurteilt werden, da Patientinnen mit Knochenmetastasen als einzigem Manifestationsort der Metastasierung in die AGO-Studie „EC versus ET“ nicht eingeschlossen wurden.

Bei nodal-positiven Patientinnen gilt in zahlreichen Studien die HER-2/*neu*-Überexpression als Hinweis auf eine schlechtere Prognose, d.h. kürzeres rezidivfreies Intervall und Gesamtüberleben [8; 35; 104; 105]. Bei metastasiertem Mammakarzinom ist HER-2/*neu* ebenfalls mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert [6; 106].

In dem in dieser Arbeit untersuchten Patientinnenkollektiv mit metastasiertem Mammakarzinom läßt sich ein deutlicher Trend zu kürzerem progressionsfreien Intervall in Zusammenhang mit erhöhten HER-2/*neu*-Werten erkennen. Je höher der Grenzwert gewählt wird, desto kürzer wird auch das mediane progressionsfreie Intervall. Das mediane PFI verkürzt sich von 7,1 Monaten bei Werten  $> 12$  ng/ml vs 7,1 Monate bei Werten  $\leq 12$  ng/ml auf 5,3 Monate vs. 8 Monate (cut-off Level: 17 ng/ml) auf 4,4 Monate vs. 8 Monate (cut-off Level: 30 ng/ml). Für das Gesamtüberleben läßt sich dieser Trend bei alleiniger Betrachtung der Mediane nicht verfolgen. Es ergibt sich kein großer Unterschied im Gesamtüberleben in Zusammenhang mit verschiedenen Grenzwerten für HER-2/*neu*. Trotzdem versterben im ersten Beobachtungsjahr mehr Patientinnen mit erhöhten HER-

---

2/neu-Werten ( $> 17$  ng/ml) ( $p=0,02$  im Test nach Breslow). Andere Studien konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen HER-2/neu-Konzentration im Serum und Gesamtüberleben aufzeigen [6; 106]. Allerdings ergab sich auch für die im Labor von Dennis J. Slamon mittels immunhistochemischer Untersuchung der Primärtumoren vorgenommenen Einteilung der Patientinnen in HER-2/neu-positiv und -negativ kein Unterschied im Gesamtüberleben sowie im progressionsfreien Intervall in beiden Gruppen.

Signifikanten Einfluß auf die Überlebenschancen hat in dieser Arbeit lediglich die Metastasenlokalisation ( $p= 0,038$ ). Patientinnen mit Lebermetastasen haben die schlechteste Überlebenschancen. Da 56% aller Patientinnen Lebermetastasen haben und insgesamt sogar 80% der Patientinnen viszeral metastasiert sind, handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen um ein Hochrisikokollektiv.

Bedenkt man, daß der Median des Gesamtüberlebens der Patientinnen in dieser Arbeit bei nur 8,2 Monaten (Spannweite: 0,5 – 34,4 Monate) lag, so erscheint es umso schwerer, statistisch signifikante Zusammenhänge ermitteln zu können. Wählt man den Beobachtungszeitraum entsprechend kurz (12 Monate), können auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv signifikante Zusammenhänge zwischen HER-2/neu-Status (cut-off Level 17 ng/ml) und Gesamtüberleben ermittelt werden ( $p=0,02$ ). Bis zu dem Zeitpunkt von 12 Monaten waren 72% der Patientinnen mit erhöhten HER-2/neu-Konzentrationen  $> 17$  ng/ml verstorben im Gegensatz zu 41% der Patientinnen mit Werten  $\leq 17$  ng/ml.

#### **4.4. Prädiktiver Wert von HER-2/neu**

Die Identifizierung biologischer Marker, die das Ansprechen auf die Chemotherapie vorhersagbar machen, ist zu einem bedeutenden Ziel in der Mammakarzinomforschung geworden. Dennoch bleibt die Einteilung der Tumoren nach biologischen Parametern in gut- und weniger gut-ansprechende Tumoren schwierig und wird kontrovers diskutiert [15].

Retrospektive Studien konnten die Bedeutung des Proto-Onkogens HER-2/neu für das Ansprechen auf die Doxorubicin-haltige Chemotherapie [53; 54; 65] oder auf Paclitaxel [60; 61; 107] deutlich machen. In-vitro Analysen konnten zeigen, daß die Rolle der HER-2/neu-Überexpression im Ansprechen auf die Chemotherapie komplex ist [62-64].

In der metastasierten Situation ist eine kurative Therapie nicht mehr möglich. Es gilt, das progressionsfreie Intervall und das Gesamtüberleben zu verlängern und die Lebensqualität zu verbessern. Taxane stellen eine neuere Substanzgruppe in der Chemotherapie des

---

Mammakarzinoms dar. Der Einsatz von Paclitaxel in Kombination mit Epirubicin (ET) wurde in der AGO-Studie bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom klinisch erprobt und mit der konventionellen Kombination von Epirubicin mit Cyclophosphamid (EC) verglichen [96]. Es konnte jedoch kein Unterschied im Ansprechen auf die Chemotherapie zwischen den beiden Therapiearmen ermittelt werden ( $p > 0,05$ ).

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, daß mittels der Bestimmung der HER-2/*neu*-Konzentration im Serum eine Subgruppe von Patientinnen identifiziert werden kann, die von einer taxan-haltigen Chemotherapie profitiert.

Es ergibt sich jedoch kein Hinweis darauf, daß HER-2/*neu*-überexprimierende Tumoren von der Therapie mit ET profitieren können. Zahlenmäßig sprachen zwar etwas weniger Patientinnen mit erhöhten HER-2/*neu*-Werten auf die Chemotherapie mit EC an (3 vs. 8 Patientinnen bei dem Grenzwert 17 ng/ml). Der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß durch die Bestimmung von HER-2/*neu* im Serum zum Zeitpunkt der Metastasierung in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientinnenkollektiv keine Rückschlüsse auf das Ansprechen auf die Chemotherapie gezogen werden können. Es ergibt sich auch kein Hinweis darauf, daß erhöhte HER-2/*neu*-Konzentrationen im Serum zum Zeitpunkt der Metastasierung als starker prädiktiver Faktor für ein schlechteres Ansprechen auf die (anthrazyklin- und taxan-haltige) Chemotherapie gelten könnten, wie in anderen Untersuchungen behauptet [6; 102; 108]. Das von uns an 92 bezüglich Ansprechraten untersuchten Patientinnen ermittelte Ergebnis wurde durch die 177 Patientinnen, deren Primärtumoren immunhistochemisch im Labor von Dennis J. Slamon untersucht worden waren, bestätigt.

#### **4.5. Bedeutung von HER-2/*neu* als Tumormarker**

Die Bestimmung von Tumormarkern, also von Neoplasmen gebildeten oder induzierten Stoffen, wie z.B. tumorassoziierte Antigene oder Serumproteine kann dazu beitragen, den Verlauf einer Erkrankung und die Wirksamkeit der Therapie zu überwachen. Die Mehrzahl der heute im klinischen Alltag verwendeten Tumormarker zeigt eine Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und Höhe des Tumormarkers im Serum. Idealerweise sollte ein Tumormarker bei Tumorwachstum ansteigen und bei Therapieansprechen abfallen. Für CA 15-3 ist eine gute Korrelation zwischen Serumwert und Tumormasse bzw. Ansprechen auf die

---

Therapie belegt [109]. In der vorliegenden Arbeit wurde der klinisch etablierte Tumormarker CA 15-3 mit HER-2/*neu* verglichen. Es zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen HER-2/*neu* und CA 15-3 ( $r=0,6$ ), die statistisch signifikant war ( $p=0,012$ ). Colomer et al. konnten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen HER-2/*neu* und CA 15-3 zeigen ( $r=0,5$ ,  $p<0,001$ ) [102]. Krainer et al. konnten ebenfalls eine Korrelation zwischen HER-2/*neu*- und CA 15-3-Wert im Serum nachweisen ( $p<0,002$ ) [110].

Nach 3 Zyklen Chemotherapie korrelierte ein Abfall von CA 15-3 im Median um 9,14 U/ml mit einer kompletten oder partiellen Remission ( $p=0,002$ ). HER-2/*neu* fiel im Median um 5,7 ng/ml ab und korrelierte ebenfalls mit dem klinischen Ansprechen ( $p=0,006$ ). Nach mehr als 4 Zyklen Chemotherapie zeigte allerdings nur noch der Tumormarker CA 15-3 eine komplette oder partielle Remission an ( $p=0,012$ ).

Stearns et al. gehen davon aus, daß der Tumormarker CA 15-3 mit dem Therapieansprechen korreliert werden kann und deshalb während der Therapie als nützlicher Parameter zum Therapiemonitoring eingesetzt werden kann, diese Situation für HER-2/*neu* allerdings nicht gegeben ist [111].

In einer Studie von Volas et al. konnte bei 48 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Hormontherapie bei 12 Patientinnen eine Remission durch Abfall von HER-2/*neu* und bei 16 Patientinnen eine Progression durch Anstieg von HER-2/*neu* nachgewiesen werden. 20 Patientinnen konnten keine entsprechenden Werte zugeordnet werden [92]. Pegram et al. konnten HER-2/*neu*-Serumwerte von 37 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Therapie mit dem monoklonalen HER-2/*neu*-Antikörper Herceptin (Trastuzumab®) in Kombination mit Cisplatin nach 70 Therapietagen mit dem Therapieansprechen korrelieren. Patientinnen mit NC und PD zeigten einen Anstieg von HER-2/*neu* ( $p=0,006$ ) und Patientinnen mit CR oder PR zeigten einen Abfall von HER-2/*neu* ( $p=0,004$ ) [67].

Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, daß HER-2/*neu* nicht im Sinne eines klassischen Tumormarkers wie z.B. CA 15-3 genutzt werden kann. Trotzdem kann die Bestimmung von HER-2/*neu* im Serum eine einfache Möglichkeit beim Therapiemonitoring der Antikörpertherapie des metastasierten Mammakarzinoms mit z.B. Herceptin (Trastuzumab®) darstellen.

---

## 5. Zusammenfassung

Das Proto-Onkogen HER-2/*neu* (c-erbB-2) kodiert ein 185 kDa schweres trans-membranäres Glykoprotein mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität. Die extrazelluläre Domäne von HER-2/*neu* wird von der Zelloberfläche abgegeben und ist als 105 kDa-schweres Protein im Serum nachweisbar („shed antigen“). 20-35% der Mammakarzinome überexprimieren das HER-2/*neu*-Protein. Bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom korreliert die HER-2/*neu*-Überexpression im Tumor mit schlechterer Prognose und schlechterem Therapieansprechen. Studien über die Bedeutung von HER-2/*neu* bei metastasiertem Mammakarzinom kommen zu keinem einheitlichen Ergebnis. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch die Bestimmung von HER-2/*neu* im Serum zum Zeitpunkt der Metastasierung Schlußfolgerungen im Hinblick auf Prognose und Therapieansprechen zu ziehen sind. Hierzu wurden Serumwerte von HER-2/*neu* im Serum von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom bestimmt, die mit zwei unterschiedlichen anthrazyklinhaltigen Chemotherapieschemata behandelt wurden (Epirubicin/Paclitaxel vs. Epirubicin/Cyclophosphamid). Untersucht wurde außerdem die Korrelation zwischen HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor und HER-2/*neu*-Serumkonzentration zum Zeitpunkt der Metastasierung und HER-2/*neu* und dem etablierten Tumormarker CA 15-3. Serum von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (n=103) vor der ersten palliativen Chemotherapie wurden mittels Enzymimmunoassay auf ihren Gehalt an freiem HER-2/*neu*-Protein untersucht. 30 gesunde Blutspenderinnen dienten als Kontrollkollektiv. Primärtumoren (n=29) wurden mittels Immunhistochemie (Antikörper CB 11) auf die HER-2/*neu*-Expression untersucht. CA 15-3-Konzentrationen wurden mittels Mikropartikel-Enzymimmunoassay bestimmt. 51,5% der Patientinnen hatten HER-2/*neu*-Werte im Serum über dem von uns festgelegten Grenzwert von 12ng/ml (Median=12,7 ng/ml). Keine Patientin aus der Kontrollgruppe hatte Serumwerte >12 ng/ml (Median=8,8 ng/ml). Es existiert eine Korrelation zwischen immunhistochemischer Bestimmung der HER-2/*neu*-Überexpression im Primärtumor und der Serumkonzentration des freien Antigens zum Zeitpunkt der Metastasierung in unserem Kollektiv (p=0,018). Im Hinblick auf die Prognose zeigte sich ein Trend zu kürzerem progressionsfreiem Intervall und Gesamtüberleben bei hohen HER-2/*neu*-Werten (p>0,05). Im Ansprechen auf die Therapie ergaben sich keine Unterschiede zwischen Patientinnen mit erhöhten oder niedrigen HER-2/*neu*-Serumwerten. Es zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen HER-2/*neu* und CA 15-3 (r=0,6; p=0,012).

---

Ein Abfall von HER-2/*neu* nach 3 Zyklen Chemotherapie korrelierte mit einer kompletten bzw. partiellen Remission ( $p=0,006$ ).

---

## 6. Abkürzungen

<b>AGO</b>	Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie der Deutschen Krebsgesellschaft
<b>CAF</b>	Cyclophosphamid, Adriamycin und 5-Fluorouracil
<b>CMF</b>	Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil
<b>CR</b>	complete remission = komplette Remission
<b>DCIS</b>	duktales Carcinoma in situ
<b>EC</b>	Epirubicin und Cyclophosphamid
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ER</b>	Östrogenrezeptor
<b>ET</b>	Epirubicin und Taxol (Paclitaxel)
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>HER-2/<i>neu</i></b>	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 = c-erbB-2
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>NC</b>	no change = keine Veränderung
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>OS</b>	overall survival = Gesamtüberleben
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PD</b>	progressive disease = Progression
<b>PFI</b>	Progressionsfreies Intervall
<b>PR</b>	partial response = partielle Remission
<b>U</b>	Units
<b>UICC</b>	Union International Contre Le Cancer

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 2. aktualisierte Ausgabe, 35-36. Saarbrücken, 1999.
2. TNM Classification of malignant tumours. UICC. 4th Edition, 93-99. 1987. Springer Verlag New York.
3. Bloom HJG, Richardson WW (1957): Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 559 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer* 11:359-377.
4. Pfleiderer, Albrecht, Breckwoldt, Meinert, and Martius, Gerhard. Gynäkologie und Geburtshilfe. 3, 217-227. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999.
5. Ross JS, Fletcher JA (1998): The HER-2/*neu* Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The Oncologist* 3:237-252.
6. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jäger W (1998): The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 55:33-38.
7. Schlechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene ML, Weinberg RA (1984): The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185.000-M tumour antigen. *Nature* 312:513-516.
8. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golough R, Reed R (1992): Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 10:1049-1056.
9. Gullick WJ, Berger MS, Bennett PLP, Rothbard JB, Waterfield MD (1987): Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells. *International Journal of Cancer* 40:246-254.

- 
10. Brandt-Rauf P, Pincus MR, Carney WP (1994): The *c-erbB-2* Protein in Oncogenesis: Molecular Structure to Molecular Epidemiology. Critical Reviews in Oncogenesis 5:313-329.
  11. Andersen TI, Paus E, Nesland JM, McKenzie SJ, Børresen A-L (1995): DETECTION OF C-ERBB-2 RELATED PROTEIN IN SERA FROM BREAST CANCER PATIENTS. Acta Oncologica 34:499-504.
  12. Tzahar E, Yarden Y (1997): The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. Biochimica et Biophysica Acta 1377:M25-M37
  13. Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin TM, Szolosi J (1999): Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. Pathology and Oncology Research 5:255-271.
  14. Wang Z, Zhang L, Yeung TK, Chen X (1999): Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. Molecular Biology of the Cell 10:1621-1636.
  15. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM (2000): Role of HER2 Gene Overexpression in Breast Carcinoma. Journal of Cellular Physiology 182:150-162.
  16. Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL (2000): ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. Journal of Cell Biology 148:385-397.
  17. Carter WB, Hoying JB, Boswell C, Williams SK (2001): HER2/neu over-expression induces endothelial cell retraction. International Journal of Cancer 91:295-299.
  18. Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, Adam L, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Vadlamudi RK, Kumar R (2001): Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. Nature cell biology 3:30-37.

- 
19. Harari D, Yarden Y (2000): Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19:6102-6114.
  20. Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W (1991): The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells SK-BR-3. *Journal of Biology and Chemistry* 66:1716-1720.
  21. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J (1999): Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Research* 59:1196-1201.
  22. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Pandiella A (1999): Signalling-competent truncated forms of ErbB2 in breast cancer cells: differential regulation by protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemical Journal* 344:339-348.
  23. Carney WP, Hamer PJ, Petit D, Retos C (1991): Detection and Quantitation of the Human Neu Oncoprotein. *Journal of Tumor Marker Oncology* 6:53-72.
  24. Meden H, Mielke S, Schauer A, Kuhn W (1997): Serum Levels of the c-erbB-2 (HER2/neu) Encoded Oncoprotein Fragment p105 in Normal Pregnancies. *in vivo* 11:51-54.
  25. Meden H, Marx D, Fattahi A, Rath W, Kron M, Wuttke W, Schauer A, Kuhn W (1994): Elevated serum levels of a c-erbB-2 oncogene product in ovarian cancer patients and in pregnancy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 120:378-381.
  26. Meden H, Mielke S, Wuttke W, Kuhn W (1997): Elevated Serum Levels of the c-erbB-2 Encoded Oncoprotein Fragment in Cases of Pure Preeclampsia and HELLP Syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynecology* 23:213-217.

- 
27. Mielke S, Meden H, Wuttke W, Kuhn W (1997): *In vivo* effects of estrogens on c-erbB-2 oncoprotein levels in chorionic villous tissue and maternal serum. *Gynecological Endocrinology* 11:237-241.
  28. McKenzie SJ, DeSombre KA, Bast BS, Hollis DR, Whitaker RS, Berchuck A, Boyer CM, Bast RC, Jr. (1993): Serum Levels of HER-2 *neu* (C-erbB-2) Correlate with Overexpression of p185<sup>neu</sup> in Human Ovarian Cancer. *Cancer* 71:3942-3946.
  29. Meden H, Marx D, Schauer A, Wuttke W, Kuhn W (1997): Prognostic Significance of p105 (c-erbB-2, HER2/neu) Serum Levels in Patients with Ovarian Cancer. *Anticancer Research* 17:757-760.
  30. Marx D, Fattahi-Meibodi A, Kudelka R, Uebel T, Kuhn W, Meden H (1998): Detection of p105 (c-erbB-2, HER2/neu) Serum Levels by a New ELISA in Patients with Ovarian Carcinoma. *Anticancer Research* 18:2891-2894.
  31. Okada N, Ohshio G, Yamaki K-I, Imamura T, Imamura M (1995): Elevated Serum c-erbB-2 Protein Levels in Patients with Pancreatic Cancer: Correlation to Metastasis and Shorter Survival. *Oncology* 52:392-396.
  32. Vidgren V, Varis A, Kokkola A, Monni O, Puolakkainen P, Nordling S, Forozan F, Kallioniemi A, Vakkari ML, Kivilaakso E, Knuutila S (1999): Concomitant gastrin and ERBB2 gene amplifications at 17q12-q21 in the intestinal type of gastric cancer. *Genes Chromosomes and Cancer* 24:24-29.
  33. Disis ML, Pupa SM, Gralow JR, Dittadi R, Cheever MA (1997): High-Titer HER-2/*neu* Protein-Specific Antibody Can Be Detected in Patients With Early-Stage Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 15:3363-3367.
  34. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/*neu* oncogene. *Science* 235:177-182.

- 
35. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989): Studies of the HER-2/*neu* Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* 244:707-712.
  36. Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998): ERBB2 Oncogene in Human Breast Cancer and its Clinica Significance. *European Journal of Cancer* 34:791-808.
  37. Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC (2000): Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* 19:490-497.
  38. Perissi V, Menini N, Cottone E, Capello D, Sacco M, Montaldo F, De-Bortoli M (2000): AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogens. *Oncogene* 19:280-288.
  39. Eдорh A, Leroux A, N'sossani B, Parache RM, Rhin B (1999): Detection by immunohistochemistry of c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinomas and benign mammary lesions. *Cellular and Molecular Biology* 45:831-840.
  40. Kandl H, Seymour L, Bezwoda WR (1994): Soluble c-erbB-2 fragment in serum correlates with disease stage and predicts more shortened survival in patients with early-stage and advanced breast cancer. *Cancer* 70:739-742.
  41. Isola JJ, Holli K, Heikki O, Teramoto Y, Kallioniemi O-P (1994): Elevated *erbB-2* Oncoprotein Levels in Preoperative and Follow-up Serum Samples Define an Aggressive Disease Course in Patients with Breast Cancer. *Cancer* 73:652-658.
  42. Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Muñoz M, Farrus B, Latre ML, Gimenez N, Hage M, Estape J, Ballesta AM (1996): C-*erbB-2* Oncoprotein in the Sera an Tissue of Patients with Breast Cancer. Utility in Prognosis. *Anticancer Research* 16:2295-2300.
  43. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harold H, Demers L, Lipton A (1995): Elevated Serum c-*erbB-2* Antigen Levels and

---

Decreased Response to Hormone Therapy of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 13:1129-1135.

44. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hösch S, Hayes DF (1997): Prediction of Response to Antiestrogen Therapy in Advanced Breast Cancer Patients by Pretreatment Circulating Levels of Extracellular Domain of the HER-2/c-neu Protein. *Journal of Clinical Oncology* 15:2518-2525.
45. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW (1999): Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *British Journal of Cancer* 79:1220-1226.
46. Kumar R, Mandal M, Lipton A, Harvey H, Thompson CB (1996): Overexpression of HER2 Modulates Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, and Tamoxifen-induced Apoptosis in Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 2:1215-1219.
47. Giai M, Roagna R, Ponzzone R (1994): Prognostic and predictive relevance of *c-erbB-2* and *ras* expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Research* 14:1441-1450.(Abstract)
48. Koechli OR, Perewusnyk G, Fehr MK, Droese S, Mueller H (1999): ErbB-2 expression does not predict in vitro CMF-chemosensitivity of primary breast tumors. *Anticancer Research* 19:3977-3983.
49. Ménard S, Valagussa P, Pilotti S, Biganzoli E, Boracchi P, Tomasic G, Casalini P, Marubini E, Colnaghi MI, Cascinelli N, Bonadonna G (1999): HER2 overexpression and response to CMF in lymph node-positive breast cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 18:69a
50. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione C, Budman DR, Wood WC, Barcos M (1994): C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *New England Journal of Medicine* 330:1260-1266.

- 
51. Harris LN, Yang L, Tang C, Yang D, Lupu R (1998): Induction of Sensitivity to Doxorubicin and Etoposide by Transfection of MCF-7 Breast Cancer Cells with heregulin  $\beta$ -2. *Clinical Cancer Research* 4:1005-1012.
  52. Jarvinen TA, Tanner M, Barlund M, Borg A, Isola J (1999): Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes and Cancer* 26:142-150.
  53. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirrincione C, Edgerton S, Allred C, Norton L, Liu ET (1998): erbB-2, p53, and Efficacy of Adjuvant Therapy in Lymph Node-Positive Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1346-1360.
  54. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyamns D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N (1998): erbB-2 and Response to Doxorubicin in Patients With Axillary Lymph Node-Positive, Hormone Receptor-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 90:1361-1370.
  55. Fehm T, Maimonis P, Weitz St, Teramoto Y, Katalinic A, Jäger W (1997): Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 43:87-95.
  56. Untch M, Thomssen Ch, Kahlert D (1998): Lack of c-erbB-2 overexpression predicts better response to dose intensification of anthracycline-based chemotherapy in high-risk breast cancer. Abstract no.110 presented at the San Antonio Breast Cancer Conference (Abstract)
  57. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B (1998): No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *International Journal of Cancer* 79:27-33.
  58. Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K (1997): Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *British Journal of Cancer* 76:917-922.

- 
59. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C (1998): p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 16:470-479.
  60. Gianni M, Capri G, Mezzelani A (1997): HER-2/*neu* (HER2) amplification and response to doxorubicin/paclitaxel (AT) in women with metastatic breast cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 16 (Abstract)
  61. Baselga JM, Seidman AD, Rosen PP, Norton L (1997): HER2 Overexpression and Paclitaxel Sensitivity in Breast Cancer: Therapeutic Implications. *Oncology* 11:43-48.
  62. Ciardello F, Caputo R, Pomatico G, DeLaurenzis M, DePlacido S, Bianco RA, Tortora G (2000): RESISTANCE TO TAXANES IS INDUCED BY c-erbB-2 OVEREXPRESSION IN HUMAN MCF-10A MAMMARY EPITHELIAL CELLS AND IS BLOCKED BY COMBINED TREATMENT WITH AN ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TARGETING TYPE I PROTEIN KINASE A. *International Journal of Cancer* 85:710-715.
  63. Yu D, Liu B, Tan M (1996): Overexpression of c-*erbB-2/neu* in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via *mdr-1*-independent mechanisms. *Oncogene* 13:1359-1365.
  64. Yu D, Jing T, Liu B, Yao T-Y, Tan M, McDonnell TJ, Hung MC (1998): Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Molecular Cell* 2:581-591.
  65. Clark GM (1998): Should Selection of Adjuvant Chemotherapy for Patients With Breast Cancer Be Based on erbB-2 Status? *Journal of the National Cancer Institute* 90:1320-1321.
  66. Baselga J (2001): Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). *European Journal of Cancer* 37:18-24.

- 
67. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy C, Baly D, Baughman SA, Twadell T, Glaspy JA, Slamon DJ (1998): Phase II Study of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized Anti-p185<sup>HER2/neu</sup> Monoclonal Antibody Plus Cisplatin in Patients With HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory to Chemotherapy Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 16:2659-2671.
  68. Piccart M (2001): Closing remarks and treatment guidelines. *European Journal of Cancer* 37:30-33.
  69. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 344:783-792.
  70. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM, Lipton A (1997): Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Research and Treatment* 42:1-5.
  71. Albanell J, Baselga J (1999): The ErbB receptors as targets for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 4:337-351.
  72. Murray JL, Przepiorka D, Ioannides CG (2000): Clinical trials of HER-2/neu-specific vaccines. *Seminars in oncology* 27:71-75.
  73. McNeil C (1999): Using HER2 to Choose Chemotherapy in Breast Cancer: Is It Ready for the Clinic? *Journal of the National Cancer Institute* 91:110-112
  74. McManus DT, Patterson AH, Maxwell P, Humphreys MW, Anderson NH (1999): Fluorescence in situ hybridisation detection of erbB2 amplification in breast cancer fine needle aspirates. *Molecular Pathology* 52:75-77.

- 
75. Press MJ, Bernstein L, Thomas PA (1997): HER-2/*neu* gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 15:2894-2904.
  76. Depowski PL, Brien TP, Sheehan CE (1998): Prognostic significance of p34<sup>cdc2</sup> cyclin dependent kinase and MIB 1 overexpression, and HER-2/*neu* gene amplification detected by fluorescence in-situ hybridization in breast cancer. *Modern Pathology* 11:18a
  77. van-de-Vijver MJ (2001): Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). *European Journal of Cancer* 37:11-17.
  78. Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J, Russell I, Begley CG (1994): ANALYSIS OF *cerbB2* EXPRESSION USING A PANEL OF 6 COMMERCIALY AVAILABLE ANTIBODIES. *Pathology* 26:261-267.
  79. Press M, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ (1994): Sensitivity of HER-2/*neu* Antibodies in Archival Tissue Samples: Potential Source of Error in Immunohistochemical Studies of Oncogene Expression. *Cancer Research* 54:2771-2777.
  80. McKenzie SJ, Marks PJ, Lam T, Morgan J, Panicali DL, Trimpe KL, Carney WP (1989): Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human *neu* oncogene product, p 185. *Oncogene* 4:543-548.
  81. Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Pölcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M (1999): HER-2/*neu* gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer. *International Journal of Oncology* 14:2-9.
  82. Isola J, Chu L, DeVries S, Matsumura K, Chew K, Ljung BM, Waldman FM (1999): Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas. *Clinical Cancer Research* 5:4140-4145.

- 
83. Valeron PF, Chirino R, Fernandez L, Torres S, Navarro D, Aguiar J, Cabrera JJ, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC (1996): VALIDATION OF A DIFFERENTIAL PCR AND AN ELISA PROCEDURE IN STUDYING *HER-2/neu* STATUS IN BREAST CANCER. *International Journal of Cancer* 65:129-133.
  84. Wu JT, Astill ME, Gagon SD (1995): Measurement of C-erbB2 proteins in sera from patients with carcinomas and in breast tumor tissue cytosols: correlation with serum tumor markers and membrane-bound oncoproteins. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 9:151-165.
  85. Valeron PF, Chirino R, Vega V, Falcón O, Rivero JF, Torres S, León L, Fernandez L, Pestano J, Díaz-Chico B, Díaz-Chico JC (1997): Quantitative Analysis of p185<sup>HER-2/neu</sup> Protein in Breast Cancer and its Association with other Prognostic Factors. *International Journal of Cancer* 74:175-179.
  86. Mielke S, Meden H, Raab T, Wuttke W, Kuhn W (1997): Effects of Interfering and Influencing Factors on the Analyses of p105 (c-erbB-2/HER-2) Oncoprotein Fragment in Serum. *Anticancer Research* 17:3125-3128.
  87. Leitzel K, Teramoto Y, Sampson E, Mauceri J, Langton BC, Demers L, Podczaski E, Harvey H, Shambaugh S, Volas G, Weaver S, Lipton A (1992): Elevated Soluble c-erbB-2 Antigen Levels in the Serum and Effusions of a Proportion of Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* 10:1436-1443.
  88. Dittadi R, Brazzale A, Pappagallo G, Salbe C, Nascimben O, Rosabian A, Gion M (1997): ErbB2 Assay in Breast Cancer: Possibly Improved Clinical Information Using a Quantitative Method. *Anticancer Research* 17:1245-1248.
  89. Mansour OA, Zekri AR, Harvey J (1997): Tissue in serum CerbB2 and tissue EGFR in breast cancer patients. *Anticancer Research* 17:3101-3106.
  90. Molina R, Jo J, Vanon G (1996): Utility of cerbB2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and Ca 15.3. *British Journal of Cancer* 74:1126-1131.

- 
91. Willsher PC, Beaver J, Pinder S (1996): Prognostic significance of serum CerbB2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 40:251-255.
  92. Volas G, Leitzel K, Teramoto Y (1996): Serial serum C-erbB-2 levels in patients with breast carcinoma. *Cancer* 78:267-272.
  93. Révillion F, Hebbar M, Bonnetterre J (1996): Plasma CerbB2 concentrations in relation to chemotherapy in breast cancer patients. *European Journal of Cancer* 32:231-234.
  94. Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, Marler KC, Patel MK, Wild LD, Das Gupta TK (1989): Plasma c-erbB-2 Levels in Breast Cancer Patients: Prognostic Significance in Predicting Response to Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 16:2409-2416.
  95. Remmele W, Stegner H (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8:138-140.
  96. AGO-Studiengruppe (2000): 4. Zwischenauswertung der AGO-Studie "Epirubicin und Cyclophosphamid versus Epirubicin und Paclitaxel in der first-line Therapie des metastasierten Mammakarzinoms". (UnPub)
  97. Lüftner D, Akrivakis C, Henschke P, Fleige B, Pedrides, Possinger K (2000): Does an elevated serum HER2/neu level qualify breast cancer patients for Herceptin® therapy? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 126 (Suppl.):R22
  98. Schwartz MK, Smith C, Schwartz DC, Dnistrian A, Neiman I (2000): Monitoring therapy by serum HER-2/neu. *The International Journal of Biological Markers* 15:324-329.
  99. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J (1998): Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of

---

paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 58:2825-2831.

100. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF (2001): When Is a Tumor Marker Ready for Prime Time? A Case Study of *c-erbB-2* as a Predictive Factor in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 19:2334-2356.
101. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Martin de Civetta MT, Ciocca DR (1999): *c-erbB-2* (HER-2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer* 84:129-134.
102. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A, Massuti B, Cortes-Funes H, Lloveras B (2000): Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research* 6:2356-2362.
103. Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, Clark GM, Mark C, Lee-Chen GJ, Pounds GW, Vendely P, Owens MA, Pandian MR (1992): Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 84:1279-1282.
104. Tetu B, Brisson J (1994): Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer* 73:2359-2365.
105. Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de-Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM (1995): The prognostic value of *c-erbB2* in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Research and Treatment* 35:283-291.
106. Stender MJ, Neuberg D, Wood W, Sledge G (1997): Correlation of circulating *c-erb B-2* extracellular domain (Her-2) with clinical outcome in patients with metastatic breast cancer (MBC). *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 541a (Abstract)

- 
107. Seidman AD, Baselga JM, Yao T-Y (1996): HER-2/*neu*-overexpression and clinical taxane sensitivity: a multivariate analysis in patients with metastatic breast cancer (MBC). Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 15 (Abstract)
  108. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Martín M, Massuti B, Cortes-Funes H, Vega FJ, Benito MD (1997): Circulating HER-2/*neu* predicts resistance to Taxol® /Adriamycin® in metastatic breast carcinoma: preliminary results of a multicentric prospective study. Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 492a (Abstract)
  109. Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N (2000): CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. The International Journal of Biological Markers 15:330-333.
  110. Krainer M, Brodowicz T, Zeillinger R, Wiltschke C, Scholten C, Seifert M, Kubista E, Zielinski CC (1997): Tissue expression and serum levels of HER-2/*neu* in patients with breast cancer. Oncology 54:475-481.
  111. Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF (1998): Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. Breast Cancer Research and Treatment 52:239-259.

---

## 8. Anhang

### **Informationsblatt und Einwilligungserklärung**

#### **Wissenschaftliche Studie zur Verbesserung der Therapie von Brustkrebserkrankungen**

##### **Bitte um Einwilligung zur Untersuchung einer Blutprobe von gesunden Blutspenderinnen als Normal-Kontrollkollektiv**

Die Universitäts-Frauenklinik Hamburg ist als forschendes Lehrkrankenhaus ein Teil der weltweiten Wissenschaftsgemeinde. Wichtige neue Behandlungsformen wie z.B. die brusterhaltende Therapie beim Brustkrebs wurden in dieser Klinik mitentwickelt und vorangetrieben. Um den wissenschaftlichen Fortschritt auf diesem Gebiet im Dienste der Patientin voranzutreiben, sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen.

In unserer Studie geht es um die Bestimmung eines sog. Proto-Onkogens (HER2/neu), ein Bluteiweiß, welches in manchen Fällen einer Brustkrebserkrankung in erhöhter Konzentration im Blut nachgewiesen werden kann. Wir wollen in Abhängigkeit von diesem Wert das Ansprechen auf unterschiedliche Medikamente zur Krebsbekämpfung untersuchen. Eine kleine Menge Blut, 10 Kubikzentimeter, die im Rahmen der Blutspende zusätzlich ohne Nachteile für Sie gewonnen wird, dient zur Bestimmung des Normalwertes in der Bevölkerung.

Wir möchten darauf hinweisen, daß sich beim derzeitigen Stand der Forschung für die klinisch gesunde Patientin keine Konsequenzen aus den zu bestimmenden Werten ergeben und daß ein erhöhter Wert des HER2/neu noch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer bösartigen Erkrankung gibt.

Sollten wir unerwarteterweise bei Ihnen einen erhöhten Wert des Proto-Onkogens HER2/neu finden, werden wir Sie umgehend benachrichtigen, so daß Sie sich einer frauenärztlichen Vorsorgeuntersuchung unterziehen können.

Falls Sie nichts von uns hören, lag Ihr Wert im Normalbereich.

Bitte unterstützen Sie uns bei dieser wichtigen Studie und ermöglichen Sie uns die wissenschaftliche Auswertung Ihrer Blutspende.

---

**Ich habe das Informationsblatt aufmerksam gelesen, den Inhalt verstanden und hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen.**

**Ich erkläre mich durch meine Unterschrift damit einverstanden, daß eine kleine Menge Blut, die im Rahmen der heutigen Blutspende zusätzlich entnommen wird, für das oben genannte wissenschaftliche Projekt genutzt wird.**

**Alle Befunde werden gemäß Datenschutzbestimmungen bei späterer Veröffentlichung selbstverständlich anonymisiert.**

**Eine Kopie dieser Erklärung wird mir übergeben.**

Hamburg, den \_\_\_\_\_  
Name der Patientin                      Name des/r Aufklärenden

Name der Patientin: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Adresse/Telefonnummer: \_\_\_\_\_

---

## 9. Danksagungen

Im besonderen liegt es mir am Herzen, Herrn Professor Doktor Thomssen zu danken für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für die zahlreichen Hilfestellungen und die Möglichkeiten zur Präsentation der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt zugleich Herrn Dr. V. Müller für die Betreuung der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung bei Fragen zur Durchführung, Auswertung und Präsentation der Arbeit.

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Pantel verpflichtet für die Hilfe bei der Etablierung des Enzymimmunoassays.

Ich danke Herrn Prof. Berger, Abteilung für Mathematik, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung des Zahlenmaterials.

Des weiteren danke ich Herrn Prof. Kühnle, Abteilung für Transfusionsmedizin, für die Zustimmung zur Durchführung von Blutentnahmen bei Blutspenderinnen, Herrn Prof. Löning, Abteilung für Gynäkopathologie, für die Überlassung der Immunhistochemie, Frau Dr. Ramirez, Abteilung für Gynäkopathologie, für die Auswertung der Immunhistochemie und Herrn Prof. Wagener, Abteilung für Klinische Chemie, für die Überlassung der CA 15-3-Werte.

Außerdem danke ich Frau Andreas und Frau Baack für die freundliche Aufnahme im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik und die geduldige Einarbeitung in die Labortechniken.

Den teilnehmenden Kliniken der AGO-Studiengruppe danke ich für die Zusendung der Seren und Herrn Dr. Hinke danke ich für die Überlassung der Studiendaten.

---

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Witzel  
Vorname: Isabell Diana  
Geburtsdatum: 4. Oktober. 1975  
Geburtsort: Rotthalmünster (Ndby.)  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1981-85 Grundschule Griesbach  
1985-94 Wilhelm-Diess-Gymnasium Pocking, Abitur

### Auslandsaufenthalt

1994/95 Soziales Jahr im Waisenhaus „Hogar Don Bosco“, Santa Cruz, Bolivien

### Studium

1995-1998 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg  
1998-jetzt Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
seit 05/2001 Praktisches Jahr an der Universität Hamburg.  
University of Nottingham und der Università di Verona  
08/1997 Ärztliche Vorprüfung  
08/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion

Seit 10/98 Doktorarbeit „Prognostische und prädiktive Bedeutung von HER-2/*neu*  
im Serum bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter  
adjuvanter Chemotherapie“ bei PD Dr. Chr. Thomssen,  
Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf

---

## 11. Erklärung

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

.....