

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Anleitung von PD Dr. Ronald Simon

Prävalenz und prognostische Relevanz der Amplifikation von HER2,
CMYC und CCND1 in Tumoren von Tamoxifen-behandelten
Brustkrebspatientinnen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Felix Moek
aus Alzenau i.Ufr.

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Das Mammakarzinom.....	4
1.2	Systemische Therapie.....	6
1.3	Genamplifikationen beim Mammakarzinom und Tamoxifen-Resistenz.....	9
1.3.1	HER2.....	10
1.3.2	CCND1.....	10
1.3.3	CMYC.....	11
1.4	Ziel der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Untersuchungsmaterial.....	13
2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	15
2.3	Auswertung.....	16
2.4	Statistik.....	16
3	Ergebnisse.....	17
3.1	FISH-Amplifikationen von HER2, CCND1 und MYC.....	17
3.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von HER2.....	22
3.3	Vergleich von Immunhistochemie und FISH bei HER2.....	24
3.4	Bedeutung der Genamplifikation für die Prädiktion des Tamoxifen-Therapieerfolges.....	24
4	Diskussion.....	34
5	Zusammenfassung.....	42
6	Literaturverzeichnis.....	43
7	Danksagung.....	51
8	Lebenslauf.....	52
9	Eidesstattliche Erklärung.....	53

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom gehört zu den bedeutsamsten Krebserkrankungen der Welt. Nach Angaben der IARC (International Association on Research of Cancer) erkranken weltweit pro Jahr etwa 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs, 410.000 sterben daran (Ferlay et al. 2002). Brustkrebs ist damit die häufigste Krebserkrankung der Frau. Das mittlere Lebenszeitrisko liegt zwischen 9 und 10 Prozent. Dies bedeutet, dass jede 10. bis 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken wird (Giersiepen et al. 2005). Seit den 60er Jahren steigt die Inzidenz des Mammakarzinoms pro Jahr in etwa um 1 bis 2% an, vor allem bei Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren. Seit dem Jahr 2000 konnte aber auch ein steter Rückgang der Mortalität für dieselbe Altersgruppe um circa 2% verzeichnet werden (Héry et al. 2008). Diese verminderte Sterberate ist wohl auf die verbesserte und flächendeckendere Krebsfrüherkennung sowie auf Fortschritte in der systemischen, insbesondere in der antihormonellen Therapie zurückzuführen. Dennoch liegt die Letalität des Brustkrebses in Deutschland über alle Stadien gemittelt bei etwa 30% (RKI 2008). Wie bei den meisten soliden Tumoren des menschlichen Körpers wird auch für das Mammakarzinom als erste Therapieoption eine operative Entfernung angestrebt, sofern das (systemische) Krankheitsstadium einen kurativen Therapieansatz erlaubt oder es zur erheblichen symptomatischen Besserung der Patientin führt. Die Operation ist die zunächst wichtigste Behandlungsmethode, die sich heutzutage in 60 bis 70% der Fälle - auch aufgrund der besseren Früherkennung - als brusterhaltende Therapie durchführen lässt (Janni et al. 2005). Da aber sogar bei der radikalen Mastektomie nach 10 Jahren immer noch Rezidiv-Raten von ca. 50% auftreten (Fisher et al. 1978), ist gemäß der "Fisher-Doktrin" davon auszugehen, dass sich bei Diagnosestellung bereits (Fern-) Metastasen gebildet haben, auch wenn diese mit der aktuellen Diagnostik bislang nicht detektierbar sind. Aus diesem Grund ist auch in frühen Stadien des Brustkrebses eine systemische (neo-)adjuvante Therapie angezeigt (Travis

2005). Dementsprechend handelt es sich beim invasiven Mammakarzinom schon primär um eine systemische Erkrankung und weniger um ein auf eine lokale Pathologie beschränktes Ereignis.

Das Mammakarzinom zählt zu den Tumoren, bei denen sich eine (neo-)adjuvante Therapie prognoseverbessernd auswirkt. Die Metaanalysen der Early Breast Cancer Trialists' Cooperative Group (EBCTCG) haben wiederholt gezeigt, dass die adjuvante systemische Therapie in Form einer zytotoxischen Polychemotherapie und/oder einer endokrinen Therapie sowohl das rezidivfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben in allen Altersgruppen unabhängig vom Nodalstatus substantiell verbessert (EBCTCG 2005, EBCTCG 2006). Die adjuvante endokrine Therapie (z.B. Tamoxifen) oder Chemotherapie (Anthracycline) können die kumulativen 15-Jahres-Mortalitätsraten für sich alleine jeweils um etwa 30 % senken, als Kombination offenbar noch effektiver. Auch wenn der Effekt der (neo-)adjuvanten, zytostatischen und hormonellen Behandlung sich bewiesenermaßen günstig auf den Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom auswirkt, sind die mit diesen Behandlungen einhergehenden, teilweise erheblichen Nebenwirkungen zu berücksichtigen. Daher gilt es, jene Patienten zu identifizieren, die auch tatsächlich von einer solchen Behandlung profitieren.

Trotz der Fortschritte in der Hormon- und Chemotherapie ist die Mortalität beim Mammakarzinom weiterhin hoch, was auch durch die Variabilität seines Verhaltens bedingt wird, die ein bisher ungelöstes und wenig verstandenes Problem darstellt: auch wenn Staging, Grading und Hormonrezeptorstatus übereinstimmen, kann sich die Prognose in verschiedenen Patienten unterscheiden (Gonzalez-Angulo et al. 2007). Um diesem Unterschied auf den Grund zu gehen, wurden andere, vor allem molekulargenetische Faktoren untersucht. Dabei konnte insbesondere die HER2/neu Gen Amplifikation und Proteinexpression identifiziert und mit Unterschieden in Prädiktion und Prognose in Verbindung gebracht werden (Ross et al. 2003).

1.2 Systemische Therapie

Neben der (Poly-)Chemotherapie, die in Abhängigkeit von der Aggressivität des Tumors beziehungsweise einem erhöhten Rezidivrisiko indiziert sein kann, hat vor allem die endokrine Therapie innerhalb der letzten 30 Jahre entscheidende Fortschritte in der Behandlung des Mammakarzinoms erzielen können. Es konnte gezeigt werden, dass auf molekulargenetischer Ebene Östrogene eine entscheidende Rolle in der Progression der Erkrankung spielen.

Der Östrogenrezeptor gehört zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren wie auch beispielsweise die Rezeptoren für Schilddrüsenhormone, Vitamin D und Retinoat. Diese Rezeptorproteine befinden sich im Zellkern und fungieren als Transkriptionsfaktoren, sobald sie eine Bindung mit ihrem entsprechenden Liganden eingegangen sind. Im Falle der Östrogenrezeptoren (ERs) unterscheidet man zwei Subtypen, ER-alpha und ER-beta (Kuiper et al. 1996). Bindet Östrogen an diese Rezeptoren, werden sie phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die zwei aktivierten Östrogenrezeptoren bilden nun Homo- oder Heterodimere und binden mit ihrer DNA-bindenden Domäne an die DNA, mit hoher Affinität zu den so genannten *estrogen response elements* (EREs) (Klein-Hitpass et al. 1988, Kumar und Chambon 1988). Durch diese Bindung initiieren sie die Expression bestimmter Gene, über deren RNA und Proteinprodukte schließlich das Wachstum der Brustdrüsenzellen verursacht beziehungsweise gefördert und somit das Brustkrebsrisiko erhöht wird (Clemons und Goss 2001).

Wie sich aus der zweifelsfrei positiven Wirkung der anti-hormonellen Therapie ableiten lässt (Fisher et al. 1999), sind ER-positive Tumoren von der wachstumsstimulierenden Wirkung des Östrogens abhängig. Mehr als zwei Drittel aller Mammakarzinome zeigen zum Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung eine Expression von ER-alpha (Stierer et al. 1993). Dadurch erwächst der Östrogenrezeptor zu einem der wichtigsten therapeutischen Ziele in der Behandlung des Mammakarzinoms überhaupt (Sunderland et al. 1991). Aus diesem Grund werden Mammakarzinome heute immer immunhistochemisch auf ihre ER-Positivität geprüft, um eine qualifizierte Entscheidung darüber treffen zu

können, ob eine anti-ER-Therapie von Nutzen ist (Andersen et al. 1989).

Seit über 30 Jahren wird Tamoxifen erfolgreich zur anti-ER-Therapie eingesetzt. Auch wenn es in Zukunft vor allem für postmenopausale Patientinnen an Bedeutung verlieren könnte (Chustecka 2006), war es in den letzten Jahren das am häufigsten verschriebene Medikament zu diesem Zweck. Tamoxifen gehört zur Familie der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs). Diese Arzneimittelgruppe wirkt am Östrogenrezeptor weder rein antagonistisch, wie zum Beispiel Antiöstrogene, noch rein agonistisch, sondern wirkt unterschiedlich auf die jeweilige Östrogenrezeptor-Untereinheit. Tamoxifen wie auch SERMs im Allgemeinen entfalten über eine kompetitive Hemmung des Östrogenrezeptors sowohl eine anti-östrogene Wirkung, vor allem im malignen Brustdrüsengewebe. Sie besitzen aber auch Östrogen-agonistische Effekte. So wirkt Tamoxifen im Endometrium als Partialagonist und kann dort neben gutartigen Polypen wahrscheinlich auch selbst Krebs verursachen (Riggs und Hartmann 2003).

Auf das Mammakarzinom wirkt Tamoxifen vor allem zytostatisch und verlangsamt die Proliferation der Brustkrebszellen, indem es die Progression des Zellzyklus von der G1 Phase inhibiert (Osborne 1998). Zudem induziert es *in vitro* den programmierten Zelltod und könnte daher auch *in vivo* apoptotische Eigenschaften besitzen (Ellis et al. 1997). Etwa die Hälfte der Frauen mit ER-positivem Mammakarzinom spricht auf die Tamoxifen-Therapie an, wohingegen lediglich 5% der ER-negativen Tumoren empfindlich für diese Behandlung sind. Einige der Patientinnen, die zunächst auf Tamoxifen ein gutes Ansprechen zeigen, entwickeln im Laufe der Zeit eine Tamoxifen-Resistenz (Osborne 1998, Hortobagyi 1998). Die Gründe für eine von Anfang an bestehende oder erworbene Resistenz sind weitestgehend unklar. Es wird vermutet, dass es aufgrund der Tamoxifen Therapie zu einer selektiven Vermehrung der ER-negativen Tumorzellen kommt (Swain 2001). Dies wäre sehr besorgniserregend, da ER-negative Tumoren in der Regel eine schlechte Prognose aufweisen. Aufgrund der Nebenwirkungen des Tamoxifens und der teils gegebenen, teils erworbenen Tamoxifen-Resistenz wurden viele neue Wirkstoffe zur endokrinen

Therapie des Brustkrebses entwickelt. Hierzu gehören andere SERMs mit ähnlicher Struktur (z.B. Toremifen) und SERMs, die sich in ihrer Struktur von Tamoxifen unterscheiden (z.B. Raloxifen).

Eine neuere Substanzgruppe sind die Aromatase-Inhibitoren, die nicht den ER-Rezeptor selbst hemmen, sondern die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen unterbinden. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Anastrozol und Exemestan. Es konnte gezeigt werden, dass Anastrozol bei postmenopausalen, ER-positiven Patienten Vorteile gegenüber Tamoxifen besitzt (Howell et al. 2005).

Neben den Östrogenrezeptoren konnte auf molekulargenetischer Ebene ein zusätzliches wichtiges therapeutisches Ziel identifiziert werden: das HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2) Rezeptorprotein. HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFRs, HER1-4), die in zahlreichen Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs zu finden sind. HER2 ist ein membranständiger Tyrosinkinase-Rezeptor, der physiologischerweise Signaltransduktionswege reguliert, die zum Wachstum und zur Differenzierung der Zelle führen. Der Rezeptor besteht aus einer Cystein-reichen extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einem lipophilen transmembranen Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. In Abhängigkeit davon, welcher Ligand an sie bindet, bilden EGFRs entweder Homo- oder Heterodimere (Gullick 2001). HER2 nimmt hierbei eine Sonderrolle ein, da er wohl nicht durch einen eigenen Liganden, sondern über Heterodimerisierung mit aktivierten HER1, 3 oder 4 Rezeptoren passiv aktiviert wird (Olayioye 2001). Nach Aktivierung werden intrinsisch spezifische Tyrosinreste des Rezeptors phosphoryliert, welche sich im zytoplasmatischen Teil des Proteins befinden. Über second messenger wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt (Schlessinger 2000), die schließlich in einer veränderten Genexpression im Zellkern mündet. Alternativ kann eine Überexpression des Rezeptors wie in Tumorgewebe dazu führen, dass es auch ohne Bindung des spezifischen Liganden zu einer spontanen Dimerisierung und damit Aktivierung des Rezeptors kommt (Hynes und Stern 1994). Obwohl der höchst komplexe Mechanismus der HER2/neu Aktivierung und der

Zusammenhang zur Krebsentstehung noch nicht vollständig geklärt ist, deutet vieles darauf hin, dass eine HER2/neu Amplifikation und Überexpression eine Signalkaskade in Gang setzt, die schließlich zur Malignität führt. Amplifikationen des Protoonkogens HER2/neu beziehungsweise Überexpression des entsprechenden Rezeptorproteins finden sich - mit unterschiedlicher prognostischer Relevanz - in zahlreichen Tumoren. Beschrieben sind unter anderem Bronchial- (Tan et al. 2003), Ovarial- (Ross et al. 1999) und Gastrointestinalkarzinome (Ross und McKenna 2001). In Mammakarzinomen zeigt sich in etwa 25-30% der Fälle eine HER2/neu Amplifikation (Pauletti et al. 1996). Eine HER2/neu Amplifikation und Überexpression geht mit einer schlechteren Prognose, höherer Rezidiv- und niedrigerer Überlebensrate einher. Neben seiner prognostischen Bedeutung gilt der HER2/neu Status auch als prädiktiver Faktor (Ross et al. 2003). Daher wird die Statusbestimmung bei jedem neu diagnostizierten Patienten mit invasivem Mammakarzinom empfohlen (NCCN 2003).

Der humane, monoklonale Antikörper Trastuzumab (Handelsname: Herceptin) bindet an die extrazelluläre Domäne des HER2 Rezeptors. Dadurch stoppt der Zellzyklus in der G1-Phase und folglich wird die Zellproliferation reduziert. Metaanalysen konnten zeigen, dass Trastuzumab bei Frauen mit HER2/neu positiven Mammakarzinomen die Rezidivrate substantiell erniedrigt und die Überlebensrate verbessert (Viani et al. 2007). Aus diesem Grund ist Trastuzumab Mittel der Wahl bei HER2-überexprimierenden Tumoren.

1.3 Genamplifikationen beim Mammakarzinom und Tamoxifen-Resistenz

Wie das Beispiel von Trastuzumab zeigt, können amplifizierte Gene eine wichtige Rolle in der Behandlung von (Tumor-)Erkrankungen spielen. Beim Mammakarzinom sind eine Reihe weiterer amplifizierter Gene beschrieben, die möglicherweise einen prognostischen und prädiktiven Stellenwert besitzen. Zu diesen Genen gehören neben HER2 auch CCND1 und CMYC, deren Bedeutung bislang noch nicht abschließend geklärt ist.

1.3.1 HER2

Eine Amplifikation/Überexpression von HER2/neu findet sich etwa in 25-30% aller Brustkrebspatientinnen und ist als negativer prognostischer Faktor anerkannt. Hohe HER2/neu Level sind häufig vergesellschaftet mit negativem ER- und Progesteronrezeptorstatus (Ferrero-Poüs et al. 2000). In ER-positiven Tumoren wird eine HER2/neu Amplifikation mit einer relativen Resistenz gegen Tamoxifen in Verbindung gebracht. Dies trifft sowohl für frühe als auch für fortgeschrittene Krankheitsstadien zu (De Laurentiis et al. 2005, Carlomagno et al. 1996). Während bei fortgeschrittener Krankheit eine Tamoxifen Behandlung bei gleichzeitiger HER2/neu Positivität praktisch keinen Effekt erzielt, sprechen HER2 negative Patientinnen recht gut auf die Therapie an (Wright et al. 1992). Als einen maßgeblichen Mechanismus für die HER2 assoziierte Tamoxifen Resistenz konnte eine vermehrte Aktivierung einer MAP-Kinase identifiziert werden, die über eine Phosphorylierung des ER alpha zu einer ER vermittelten Tamoxifen-Resistenz führt (Kurokawa et al. 2000). Dementsprechend konnte eine HER2- Amplifikation beziehungsweise HER2 Proteinüberexpression auch in zahlreichen klinischen Studien als unabhängiger Prognosefaktor in ER-positiven, hormontherapierten Kollektiven etabliert werden (Ross et al. 2009).

1.3.2 CCND1

Das Gen Cyclin D1 (CCND1) auf Chromosom 11q13 kodiert für das gleichnamige Protein. CCND1 gehört zur Familie der Cycline. Diese haben eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus inne, indem sie die so genannten Cyclin abhängigen Kinasen (CdKs) regulieren. Die Kinasen werden durch Phosphorylierung aktiviert und sorgen dann für den regelhaften Ablauf der verschiedenen mitotischen Phasen. Cyclin D1 bildet einen Komplex mit und reguliert somit Cdk4 und Cdk6, deren Aktivierung für den Übergang von der G1 in die S Phase benötigt wird. Mutationen, Überexpressionen und Amplifikationen von CCND1 wurden bei zahlreichen Tumoren, z.B. Magen- und

Ösophaguskarzinomen, beobachtet und spielen bei der Entstehung von Tumorerkrankungen möglicherweise eine wichtige Rolle (Bizari et al. 2006). Eine CCND1 Expression tritt in etwa 45- 50% der Fälle bei Mammakarzinomen auf. Oft sind Genamplifikation und Überexpression des entsprechenden Proteins assoziiert (Jirström et al. 2005). Bemerkenswerterweise kann eine Überexpression aber auch unabhängig von einer Amplifikation auftreten (Buckley et al. 1993, Gillett et al. 1994). Beim Mammakarzinom ist CCND1 in ungefähr 20% der Fälle amplifiziert und mit einem fortgeschrittenen Tumorgrad assoziiert. In knapp 30% der Fälle ist CCND1 nicht alleine amplifiziert, sondern tritt als Koamplifikation mit anderen Genen zusammen auf (Al-Kuraya et al. 2004). Darüber hinaus geht eine CCND1 Amplifikation sehr oft mit ER Positivität (Spyratos et al. 2000) und dann auch mit einer schlechteren Prognose und wohl auch mit einer Tamoxifen-Resistenz einher (Kenny et al. 1999). Es gibt erste Hinweise, dass erhöhte CCND1 Level ein negativer prädiktiver Faktor für die Tamoxifen-Therapie sein könnten (Stendahl et al. 2004). Auch laut präklinischen Studien scheint eine durch CCND1 Amplifikation/Expression vermittelte Tamoxifen-Resistenz denkbar (Kilker et al. 2004, Kilker et al. 2006, Wilcken et al. 1997, Hui et al. 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tamoxifen sogar zu einer Proliferation von CCND1 überexprimierenden Brustkrebszellen führt (Ishii et al 2008). Obwohl die Mehrzahl der Studien darauf hinweist, dass eine Überexpression beziehungsweise Amplifikation mit einer Tamoxifenresistenz einhergeht, herrscht aufgrund der nicht eindeutigen Studienlage Unklarheit darüber, ob Cyclin D1 auch als ein unabhängiger Prognosefaktor angesehen werden kann.

1.3.3 CMYC

Das CMYC (auch MYC) Gen beziehungsweise das entsprechende MYC Protein gehört zur MYC Familie: Transkriptionsfaktoren, zu denen auch N-MYC und L-MYC zählen. MYC reguliert etwa 15% aller Gene, indem es deren Expression entweder fördert oder unterbindet. Wie alle MYC Transkriptionsfaktoren besitzt

es eine basische Helix-Loop-Helix (bHLH) und eine Leukin-Zipper Domäne. Streng reguliert - beispielsweise durch äußere Wachstumssignale - bindet es mit der bHLH Domäne an die DNA insbesondere solcher Gene, die für Zellwachstum, -proliferation und Apoptose verantwortlich sind. Diese Gene werden normalerweise nur dann exprimiert, wenn die Zelle im Begriff ist, sich zu teilen. In zahlreichen Krebsarten finden sich Mutationen oder Amplifikationen von MYC, die dann eine unkontrollierte Expression dieser Gene und somit eine Entartung zur Folge haben. Damit ist MYC ein klassisches Protoonkogen. MYC ist in den unterschiedlichsten Krebsarten amplifiziert (Gardner et al. 2002). Beim Mammakarzinom zeigt sich etwa bei 5% der Karzinome eine Amplifikation. Diese ist mit einer schlechteren Prognose und ER-negativem Status assoziiert. Eine Koamplifikation zeigt sich in 65% der Fälle. Treten MYC und HER2 Amplifikation gemeinsam auf, so ist die Prognose schlechter als die jeweils isolierte Amplifikation (Al-Kuraya et al. 2004). In Tamoxifen-resistenten Tumoren finden sich besonders häufig MYC Amplifikationen. Ob diese mit einer Resistenz gegen Tamoxifen zusammenhängen oder mitverantwortlich sind, ist derzeit unklar (Planas-Silva et al. 2007).

1.4 Ziel der Arbeit

Der Östrogen-Rezeptor Inhibitor Tamoxifen ist das am häufigsten verwendete Therapeutikum bei ER-positiven Mammakarzinomen. Obwohl mit Tamoxifen seit mehr als 30 Jahren gute Behandlungserfolge erzielt werden, fehlen molekulare Marker zu Prädiktion des Therapieansprechens bzw. der Resistenz. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, einen Gewebemikroarray mit n=516 von Tamoxifen-monotherapierten (plus gegebenenfalls Polychemotherapie) Patientinnen mittels FISH-Analyse auf Genamplifikationen von HER2, CCND1 und CMYC zu untersuchen. Zum anderen sollten für diese Patientinnen klinische Follow-Up Daten erstellt werden, um eine mögliche Relevanz der amplifizierten Gene für die Resistenz gegen eine Tamoxifen Therapie zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Für diese Untersuchung stand ein Kollektiv zur Verfügung, das 814 (darunter 516 mit nur Tamoxifen als endokriner Therapie; siehe unten) Patientinnen umfasste, die sich zwischen 1997 und 2001 zur Primärtherapie eines Mammakarzinoms in die Brustklinik im Krankenhaus Jerusalem, Hamburg, begaben. Für diese Patientinnen wurde eine Gewebemikro-Array (tissue microarray, TMA) Analyse durchgeführt (Abb. 1) (Tabelle 1). Für den erstellten TMA wurden folgende Parameter berücksichtigt: Tumorlokalisierung, Art und Umfang einer radiologischen Therapie, OP-Verfahren, histologischer Typ, Nodalstatus, Tumorstadium, Grading, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, adjuvante Chemotherapie, Art der endokrinen Therapie sowie Untersuchung auf evtl. tumorrelevante Gen-Amplifikationen mittels FISH (HER2, CMYC, CCND1) und Proteinexpressionen per Immunhistochemie (HER2).

Zu dem Kollektiv zählten prä- wie auch postmenopausale Patientinnen. Von diesen gelangte jeweils ein Resektat des primären Mammakarzinoms am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Untersuchung. Von diesem Kollektiv konnten retrospektiv Daten über die durchgeführten Therapien und den klinischen Verlauf erhoben werden. Von sechs weiteren Patientinnen konnten keine klinischen Daten erhoben werden und wurden daher nicht in den Überlebensstatistiken berücksichtigt. Zur Erhebung der Daten konnten die vollständigen klinischen Patientenakten in der Brustklinik im Krankenhaus Jerusalem, Hamburg, eingesehen werden. Ein Teil der Patienten wurde in der Folge von externen Onkologen oder von Hausärzten weiter betreut. In diesen Fällen wurde der nachbehandelnde Arzt angeschrieben oder telefonisch über den weiteren Krankheitsverlauf befragt. In einigen Fällen konnten die Daten durch Einsicht der Patientenakten des Röntgenzentrums

Hamburg erhoben werden, wo ein Großteil der Patientinnen die tumorspezifischen Nachsorgeuntersuchungen (Mammographie, Sonographie, MRT) wahrnahm. Auf die folgenden Parameter wurde bei der retrospektiven klinischen Datenerhebung besonders geachtet: Art einer allfälligen postoperativen adjuvanten Therapie (wobei in der Folge für diese Studie nur die 516 Patientinnen berücksichtigt wurden, die als endokrine Therapie nur Tamoxifen erhalten hatten; etwas weniger als die Hälfte der Patientinnen erhielt zusätzlich eine adjuvante Polychemotherapie), Zeitpunkt des Auftretens von Lokalrezidiven und Metastasen sowie das Datum der letzten Nachsorgeuntersuchung bzw. das Todesdatum. Als Endpunkt wurde das Auftreten eines Rezidivs unter der Tamoxifen-Therapie gewählt. Der Zeitraum des letzten Follow-Ups bezüglich des rezidiv-freien Überlebens erstreckte sich von November 2007 bis Januar 2008.

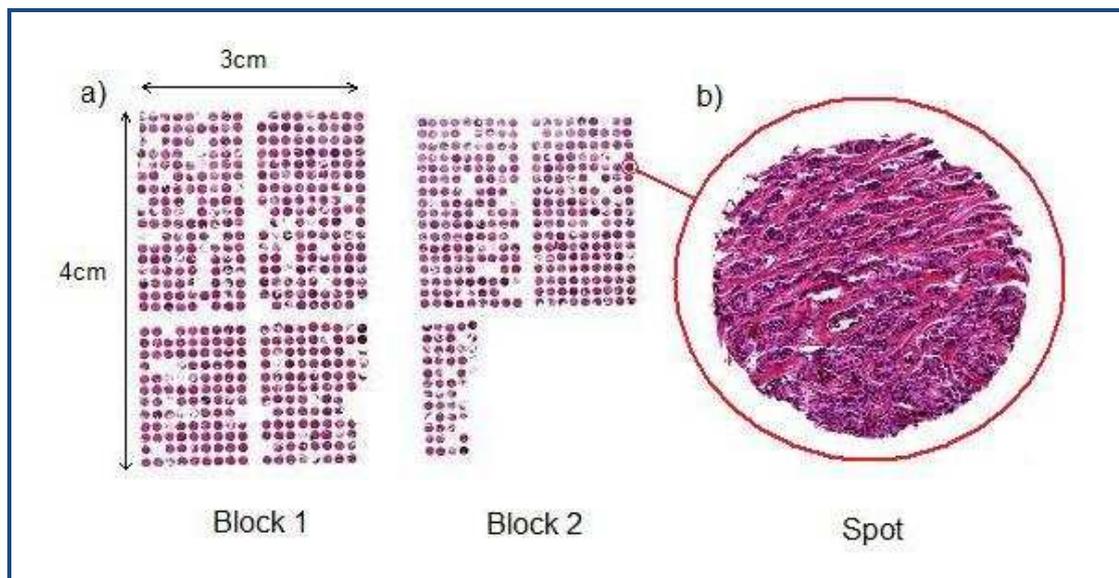


Abb. 1a) Übersicht über die beiden Gewebearray-Blöcke des verwendeten TMAs. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte. Block 1 enthält 476 Gewebespots, Block 2 338 Gewebespots. b) Vergrößerung eines Gewebespots eines Mammakarzinoms. Der Originaldurchmesser beträgt 0,6 mm.

Tabelle 1: TMA Übersicht

TMA		
	Gesamt	814
Histologie	duktal	501
	lobulär	249
	tubulär	33
	medullär	13
	muzinös	12
	papillär	4
	plattenepithelial	2
Tumorstadium	pT1	464
	pT2	286
	pT3	44
	pT4	20
Nodalstatus	pN0	544
	pN1	244
	pN2	26
Grad	1	166
	2	524
	3	123
ER-Status	negativ	155
	positiv	616

2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

5µm-Schnitte wurden mit dem VYSIS „Formalin pretreatment kit“ gemäß den Empfehlungen des Herstellers vorbehandelt. Für die Hybridisierungen wurden kommerzielle FISH Sonden der Firma Abbott verwendet. Alle verwendeten Sonden sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: FISH Sonden

Zielgen	Sonde	Kat.#	Referenz	Sonde	Kat.#
HER2	LSI HER2/neu	30-161060	Zentromer 17	CEP 17	30-161060
CCND1	LSI CCND1	32-191039	Zentromer 11	CEP 11	32-191039
CMYC	LSI MYC	32-190006	Zentromer 8	CEP 8	32-190006

Die Hybridisierung sowie die nachfolgenden Waschprozeduren erfolgten gemäß dem Vysis-Protokoll, mit den von der Firma erhältlichen Reagenzien. Die Schnittpräparate wurden danach mit 0,2mM 4'5-Diamino-2-Phenyl-Indol (DAPI) gegengefärbt.

2.3. Auswertung

Für jeden Gewebespot wurden jeweils Anzahl der Zentromere und der Gensignale für HER2, CMYC und CCND1 bestimmt. Dazu wurde die Anzahl der roten und grünen Signale im Zellkern geschätzt. Eine Genamplifikation lag vor, wenn das Verhältnis der Gensignale zu den Zentromersignalen mindestens 2.0 war (Ratio Gen: Zentromer ≥ 2.0). Alle anderen Gewebeslots wurden als nicht amplifiziert beurteilt.

2.4 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Grad des Tumors,

„Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

3. Ergebnisse

Für die vorliegende Arbeit wurden nur die 516 Gewebespots verwendet, deren Patientinnen als endokrine Therapie ausschließlich Tamoxifen erhalten hatten. Die übrigen 298 Gewebespots, die entweder keine oder eine kombinierte endokrine Therapie erhalten hatten, sind in der nachfolgenden Auswertung nicht berücksichtigt.

3.1 FISH-Amplifikationen von HER2, CCND1 und MYC

Von den 516 Tamoxifen-behandelten Tumoren des Arrays konnten 477 (92%) für HER2, 464 (90%) für CCND1 und 396 (77%) für MYC erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Bei den restlichen Tumoren konnte kein Resultat erhalten werden, weil entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte oder weil keine Fluoreszenzsignale für die entsprechenden Sonden sichtbar waren. Amplifikationen gemäß der vordefinierten Kriterien (siehe 2.3.) wurden für HER2 in 31 (6,5%), CCND1 in 53 (11,4%) und MYC in 10 (2,5%) der untersuchten Tumoren gefunden. Dabei zeigten sich in der Regel für alle drei Gene hochgradige Amplifikationen mit deutlichen Clustern von mehr als 10 Gensignalen.

HER2 Amplifikationen waren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), hohem Malignitätsgrad ($p < 0,0001$), positivem Nodalstatus

($p < 0,0001$) und einem negativen ER-Status ($p < 0,0001$) assoziiert. MYC Amplifikationen waren mit dem Malignitätsgrad assoziiert ($p = 0,019$). CCND1 Amplifikationen waren mit keinem pathologischen Parameter assoziiert. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 3a, 3b und 3c zusammengefasst.

Tabelle 3a: Zusammenhang zwischen dem Tumorphänotyp und der Häufigkeit von HER2 FISH-Amplifikationen

HER2					
		N auf TMA	N analysierbar	Amplifikationen in %	p
	Alle Tumoren	516	477	6,5	
Histologie	duktal	308	289	9,0	
	lobulär	176	159	2,5	0,0132*
	tubulär	18	16	0,0	
	muzinös	7	7	0,0	
	papillär	4	3	0,0	
	medullär	3	3	33,3	
Tumor Stadium	pT1	319	292	4,5	0,0383
	pT2	162	154	9,1	
	pT3	26	22	18,2	
	pT4	9	9	0,0	
BRE Grad	G1	123	115	0,0	<0,0001
	G2	348	320	6,3	
	G3	45	42	26,2	
Nodalstatus	pN0	360	335	3,9	0,0029
	pN1	143	130	12,3	
	pN2	13	12	16,7	
ER-Status	ER negativ	47	36	30,6	<0,0001
	ER positiv	442	426	4,7	

* vs duktales Karzinom

Tabelle 3b: Zusammenhang zwischen dem Tumorphänotyp und der Häufigkeit von CMYC FISH-Amplifikationen

CMYC					
		N auf TMA	N analysierbar	Amplifikationen in %	p
	Alle Tumoren	516	396	2,5	
Histologie	duktal	308	246	2,8	
	lobulär	176	126	1,6	
	tubulär	18	14	0,0	
	muzinös	7	6	0,0	
	papillär	4	1	0,0	
	medullär	3	3	33,3	
Tumor Stadium	pT1	319	242	2,1	0,0507
	pT2	162	127	3,9	
	pT3	26	19	0,0	
	pT4	9	8	0,0	
BRE Grad	G1	123	81	1,2	0,019
	G2	348	274	1,8	
	G3	45	41	9,8	
Nodalstatus	pN0	360	270	2,6	0,1447
	pN1	143	115	1,7	
	pN2	13	11	9,1	
ER-Status	ER negativ	47	28	3,6	0,5662
	ER positiv	442	355	2,0	

Tabelle 3c: Zusammenhang zwischen dem Tumorphänotyp und der Häufigkeit von CCND1 FISH-Amplifikationen

CCND1					
		N auf TMA	N analysierbar	Amplifikationen in %	p
	Alle Tumoren	516	464	11,4	
Histologie	duktal	308	284	12,7	
	lobulär	176	153	10,5	
	tubulär	18	15	0,0	
	muzinös	7	7	14,3	
	papillär	4	2	0,0	
	medullär	3	3	0,0	
Tumor Stadium	pT1	319	287	9,4	0,0879
	pT2	162	146	11,6	
	pT3	26	22	22,7	
	pT4	9	9	44,4	
BRE Grad	G1	123	102	5,9	0,0812
	G2	348	322	12,7	
	G3	45	40	15,0	
Nodalstatus	pN0	360	321	10,3	0,4525
	pN1	143	132	12,9	
	pN2	13	11	27,3	
ER-Status	ER negativ	47	36	8,3	0,0658
	ER positiv	442	413	11,9	

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung von HER2

Von den 516 Tumoren des Arrays konnten 469 (91%) erfolgreich mit der IHC analysiert werden. Bei 47 Tumoren konnte kein Resultat erhalten werden, weil entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte oder weil keine Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren.

Die HER2 Immunfärbung war signifikant mit fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0,0224$), entdifferenziertem Phänotyp ($p<0,0001$) und negativem ER-Status assoziiert ($p<0,0001$).

Eine Übersicht der Ergebnisse der IHC-Analyse ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen dem Tumorphänotyp und der Häufigkeit von HER2 Immunhistochemie

HER2 IHC (%)								
		N auf TMA	n analysierbar	0	1+	2+	3+	p
	Alle Tumoren	516	469	55,9	29,9	8,3	6,0	
Histologie	duktal	308	294	50,7	33,3	8,2	7,8	
	lobulär	176	150	62,7	26,0	8,7	2,7	
	tubulär	18	15	86,7	13,3	0,0	0,0	
	muzinös	7	5	60,0	0,0	40,0	0,0	
	papillär	4	2	50,0	50,0	0,0	0,0	
	medullär	3	3	66,7	0,0	0,0	33,3	
Tumor Stadium	pT1	319	283	61,8	27,9	6,0	4,2	0,0224
	pT2	162	152	48,7	32,9	10,5	7,9	
	pT3	26	25	32,0	32,0	20,0	16,0	
	pT4	9	9	55,6	33,3	11,1	0,0	
BRE Grad	G1	123	109	71,6	22,9	4,6	0,9	<0,001
	G2	348	318	52,8	32,1	9,1	6,0	
	G3	45	42	38,1	31,0	11,9	19,0	
Nodalstatus	pN0	360	321	57,3	29,6	8,4	4,7	0,5106
	pN1	143	137	51,8	30,7	8,8	8,8	
	pN2	13	11	63,6	27,3	0,0	9,1	
ER-Status	ER negativ	47	44	65,9	9,1	0,0	25,0	<0,001
	ER positiv	442	417	54,2	32,4	9,4	4,1	

3.3 Vergleich von Immunhistochemie und FISH bei HER2

Ein Ergebnis für sowohl die HER2 IHC als auch für die FISH-Analyse war in 448/516 (87%) der Tumoren vorhanden. Der Vergleich zeigte, dass HER2-Amplifikationen mit der HER2 Proteinexpression assoziiert waren ($p < 0,0001$). So zeigten 22/28 (79%) der 3+ positiven, aber nur 4/244 (1,6%) der IHC-negativen Tumoren eine HER2-Amplifikation. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich HER2-Immunhistochemie und HER2-FISH

FISH	N	IHC				p
		0	1+	2+	3+	
Amp	31	4	3	2	22	<0,0001
Normal	417	240	136	35	6	
Gesamt	448	244	139	37	28	

3.4 Bedeutung der Genamplifikation für die Prädiktion des Tamoxifen-Therapieerfolges

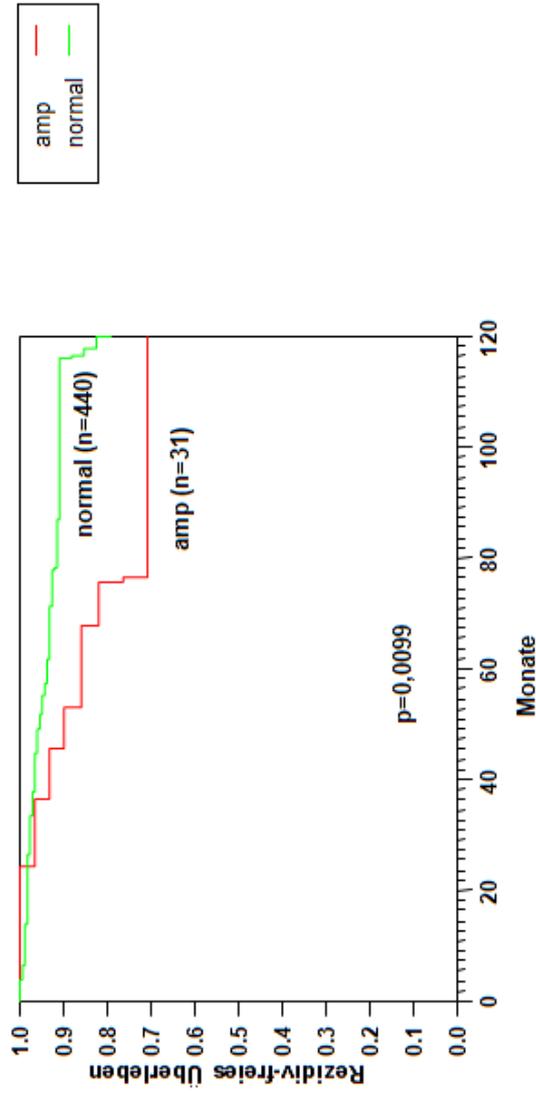
Um den Einfluss der Amplifikation von HER2, CCND1 und MYC bzw. der HER2 Proteinexpression auf das Ansprechen auf die Therapie mit Tamoxifen zu untersuchen, wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven für jeden Marker erstellt. Für die CCND1 Amplifikation wurde zudem eine separate Analyse in der Untergruppe der ER-positiven Patientinnen (gemäß der eigenen Ergebnisse) durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu erhalten, die auch die prognostische Relevanz von CCND1 zum Studienmittelpunkt hatten. Die Mehrzahl dieser Studien hatte ausschließlich ER-positive Patientinnen in ihre Analyse einbezogen.

Da der prädiktive Wert einer Tamoxifentherapie in CCND1-amplifizierten Tumoren möglicherweise durch die Verwendung einer (Poly-)chemotherapie

beeinflusst wird (siehe Diskussion), wurde für die CCND1 Amplifikation eine zusätzliche Analyse solcher Patientinnen durchgeführt, die mit ziemlicher Sicherheit keine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten (Abb. 6). Als Endpunkt wurde das Auftreten eines Rezidivs oder Ableben unter der Tamoxifen-Therapie gewählt. 6 Patientinnen wurden von der Analyse ausgeschlossen, weil keine klinischen Follow-up Daten vorhanden waren.

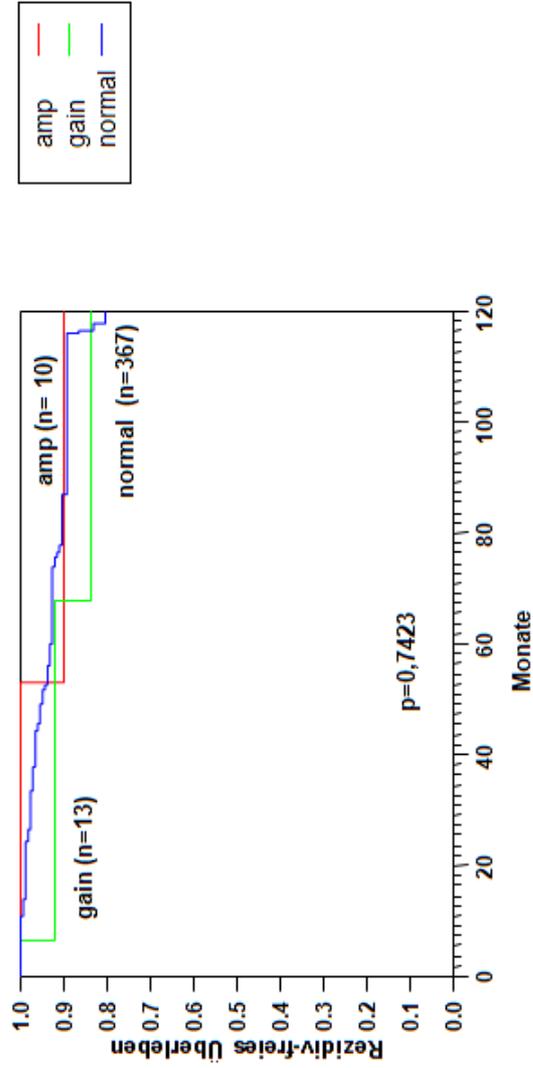
Es zeigte sich, dass sowohl HER2 Amplifikationen als auch CCND1 Amplifikationen mit einem früheren Rezidiv unter der Tamoxifen Therapie assoziiert sind (Abb. 2, Abb.4, Abb. 5). Zumindest ein Trend ($p=0,0890$) war auch für die HER2 IHC zu sehen (Abb.7). Für CMYC konnte ein derartiger Zusammenhang nicht beobachtet werden (Abb 3).

Abb. 2: Einfluss einer HER2-Amplifikation auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (p=0,0099)



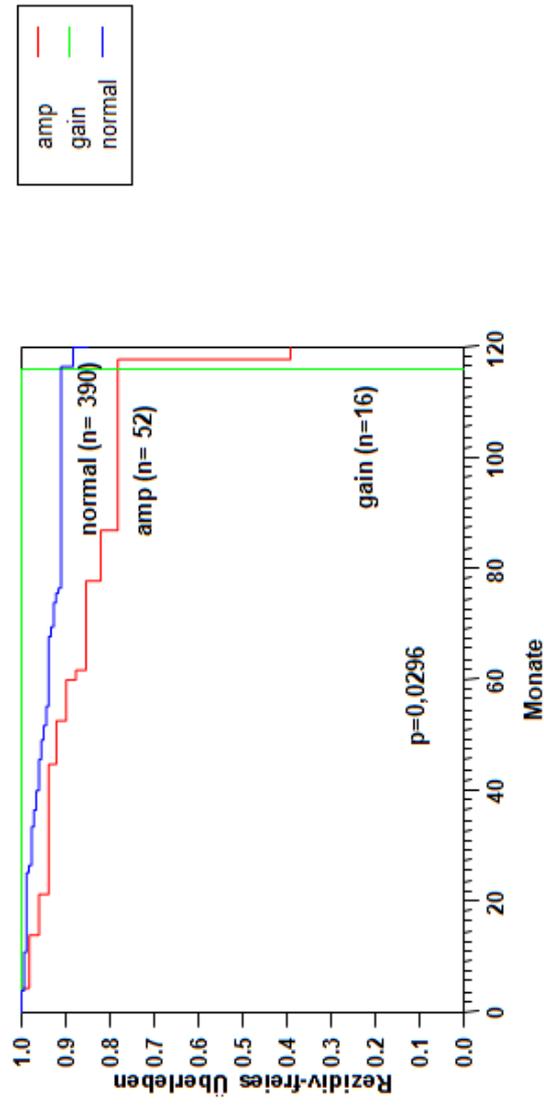
FISH	Rezidiv	Kein Rezidiv
amp	7	24
normal	36	404
Gesamt	43	428

Abb. 3: Einfluss einer MYC-Amplifikation auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (p=0,7423)



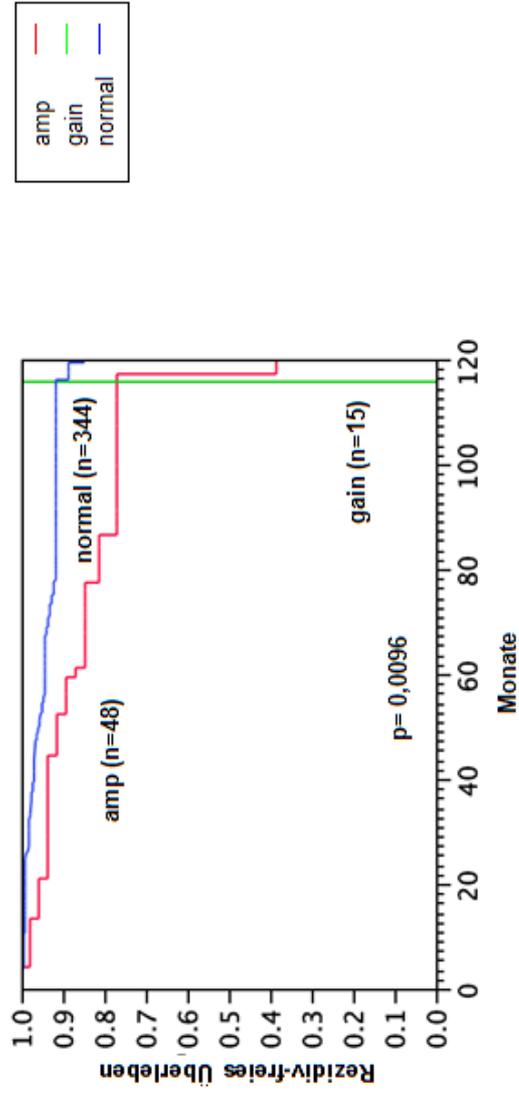
FISH	Rezidiv	Kein Rezidiv
amp	1	9
gain	2	11
normal	34	333
Gesamt	37	353

Abb. 4: Einflusseiner CCND1-Amplifikation auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (gesamtes Kollektiv; $p=0,0296$)



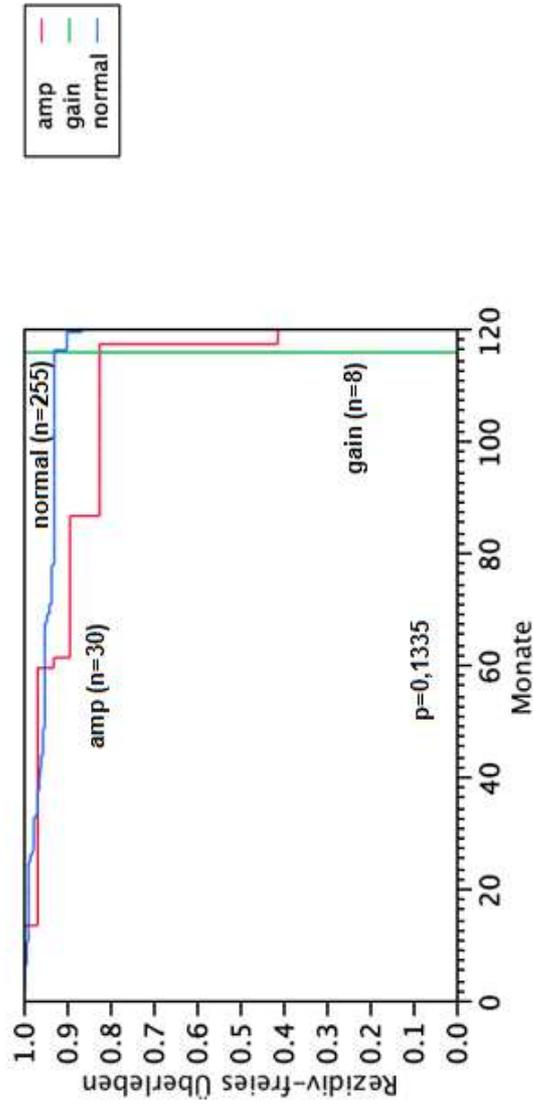
FISH	Rezidiv	Kein Rezidiv
amp	10	42
gain	1	15
normal	32	358
Gesamt	43	415

Abb. 5: Einfluss einer CCND1-Amplifikation auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (nur ER+ Patientinnen; p=0,0096)



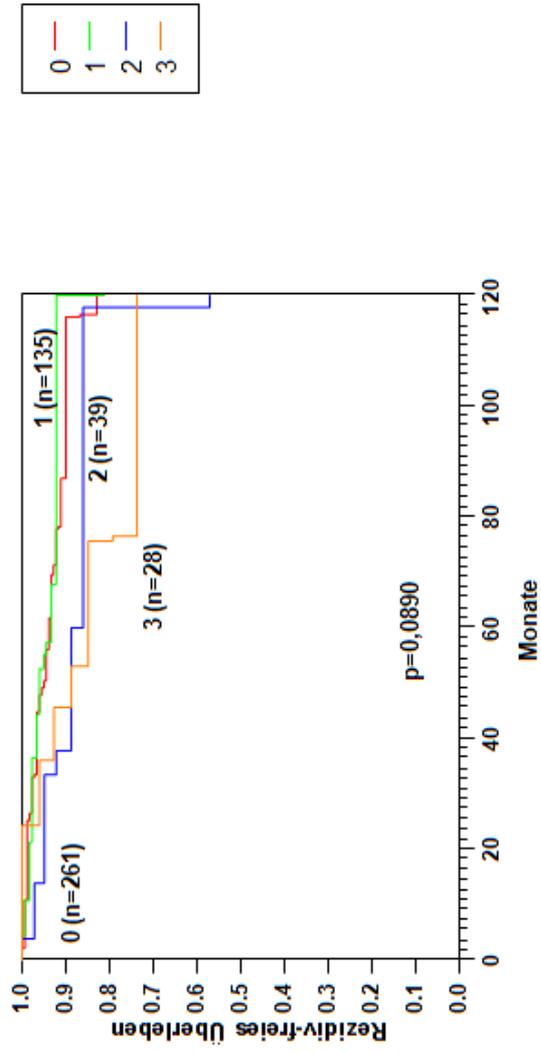
FISH	Rezidiv	Kein Rezidiv
amp	10	38
gain	1	14
Normal	26	318
Gesamt	37	370

Abb. 6: EinflusseinerCCND1-Amplifikation auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (Subset ohne Chemotherapie; p=0,1335)



FISH	Rezidiv	Kein Rezidiv
amp	5	25
gain	1	7
normal	18	237
Gesamt	24	269

Abb. 7: Einfluss einer HER2-Proteinüberexpression auf das Rezidiv-freie Überleben bei Mammakarzinom-Patientinnen mit Tamoxifen-Therapie (p=0,0890)



IHC	Rezidiv	Kein Rezidiv
0	23	238
1	10	125
2	6	33
3	6	22
Gesamt	45	418

Multivariate Analysen

Um den Einfluss von Genamplifikationen auf die Patientenprognose unter Berücksichtigung anderer bekannter Prognoseparameter zu untersuchen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Es zeigte sich kein unabhängig signifikanter Einfluß für einen der untersuchten Parameter (Tabelle 6a, 6b, 6c).

Tabelle 6a: Multivariate Analyse für die CCND1-Amplifikation

Parameter		p-Wert
pT	(1-4)	0.0949
pN	(0-2)	0.0281*
BRE Grad	(1-3)	0.0541
CCND1	amp, gain, normal	0.3811

Tabelle 6b: Multivariate Analyse für die CMYC-Amplifikation

Parameter		p-Wert
pT	(1-4)	0.1226
pN	(0-2)	0.0465*
BRE Grad	(1-3)	0.0129*
MYC	amp, gain, normal	0.8542

Tabelle 6c: Multivariate Analyse für die HER2-Amplifikation

Parameter		p-Wert
pT	(1-4)	0.0187*
pN	(0-2)	0.1796
BRE Grad	(1-3)	0.0367*
HER2	amp, normal	0.4578

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Gewebe-Mikroarray mit 814 Mammakarzinomen auf Amplifikationen der Gene HER2, Cyclin D1 und MYC untersucht. Um die prognostische Relevanz sowie den prädiktiven Wert dieser Gene insbesondere für die Tamoxifen-Therapie beurteilen zu können, konzentrierten wir uns in der Folge ausschließlich auf die 516 Patientinnen, die als endokrine Therapie lediglich Tamoxifen erhalten hatten.

Für Cyclin D1, HER2 und MYC ist eine prognostische Bedeutung für das Mammakarzinom aus zahlreichen vorhergehenden Studien belegt (Al-Kuraya et al. 2004, Cuny et al. 2000, Deming et al. 2000, Berns et al. 1992, Seshadri et al. 1996, Naidu et al. 2002). Die vorliegende Arbeit stand unter der Fragestellung, ob Amplifikationen eines oder mehrere dieser drei Gene beim Mammakarzinom mit der Resistenz gegen die anti-hormonelle Therapie mit Tamoxifen einhergehen. Hierzu wurde eine Gewebemikro-Array (tissue microarray, TMA) - Analyse von 516 Mammakarzinomen durchgeführt, die als einzige endokrine Therapie Tamoxifen erhalten hatten. Hierbei handelte es sich überwiegend um frühzeitige, kleine und gut differenzierte Tumoren. Die gefundenen Amplifikationsraten für HER2 (6,5%), CCND1 (11,4%) und MYC (2,5%) weichen daher auch deutlich von den bekannten Häufigkeiten in konsekutiven Tumorkollektiven (HER2: 15-20%, CCND1 20%, MYC 5%) ab (Al-Kuraya et al. 2004). Trotzdem waren ausreichend fortgeschrittene, entdifferenzierte und metastasierte Tumoren auf dem TMA repräsentiert, um den signifikanten Zusammenhang zwischen Amplifikation und Tumorstadium, Grad und Nodalstatus zu finden, der aus Studien mit konsekutiven Tumorkollektiven gut bekannt ist (Al-Kuraya et al. 2004, Cuny et al. 2000) .

Gen-Amplifikationen sind ein typisches Merkmal von genomischer Instabilität. Genetisch instabile Tumoren sind in der Regel durch fehlende Reparaturfähigkeit, eine große Zahl von chromosomalen Aberrationen und ein aggressives klinisches Verhalten gekennzeichnet (Lingle et al. 2002, Al-Kuraya

et al. 2004). Es ist daher nicht verwunderlich, dass Amplifikationen zumindest von HER2 und Cyclin D1 mit einer ungünstigen Prognose assoziiert waren. Für MYC konnte diese Assoziation vermutlich vor allem aufgrund der geringen Anzahl amplifizierter Tumoren (n=10) nicht bestätigt werden. Jedoch lässt auch hier die Assoziation mit Stadium und Grad darauf schließen, dass in einem größeren Kollektiv auch ein Prognose-relevanter Effekt für MYC aufgefallen wäre. Als Endpunkt in der vorliegenden Studie haben wir die Tumorrezidivierung gewählt, weil aufgrund der verhältnismäßig gutartigen Tumoren nur etwa 4,5% der Patientinnen im Beobachtungszeitraum verstorben waren und somit nicht genügend Ereignisse für eine statistisch sinnvolle Überlebensanalyse vorhanden waren.

Um die Frage zu beantworten, ob der ungünstige Einfluss der Gen-Amplifikationen in erster Linie von der Assoziation zu den ohnehin ungünstig verlaufenden fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren abhängt oder ob es einen biologisch relevanten Einfluss unabhängig von diesen Parametern gibt, haben wir eine multivariate Analyse durchgeführt, welche die klassischen prognoserelevanten Faktoren wie Tumorstadium, Nodalstatus sowie Malignitätsgrad einschloss. Es zeigte sich, dass in unserem Kollektiv keines der drei analysierten Gene eine vom Tumorstadium, Nodalstatus und Malignitätsgrad unabhängige Prognoserelevanz besaß. Dieser Befund stimmt für HER2 nur bedingt mit der bereits publizierten Literatur überein. In über 100 Studien wurde der Zusammenhang zwischen einer HER2-Amplifikation oder Überexpression mit dem Rezidivrisiko in Mammakarzinom-Patienten untersucht. In 95 (88%) dieser Studien konnte für HER2 in uni- oder multivariater Analyse eine prognostische Relevanz nachgewiesen werden. In 68 (73%) von 93 dieser Studien, die eine multivariate Analyse beinhalteten, hatte eine HER2-Amplifikation oder Proteinüberexpression einen prognostischen Wert unabhängig von allen anderen etablierten Prognoseparametern (Ross et al. 2009). Allerdings bleibt die Interpretation dieser Ergebnisse kompliziert, da die Mehrzahl der Studien Patienten untersuchte, die verschiedene systemische adjuvante Therapien erhalten hatten. Insbesondere ein Vergleich der

Patientenkollektive mit dem der hier durchgeführten Studie ist nur bedingt möglich, da die Art der adjuvanten Therapie in vorigen Studien oft nicht näher bezeichnet wurde, sich unterschied, oder keine separaten Analysen für Tamoxifen-monotherapierte Patientinnen durchgeführt wurden.

Für MYC sind bisher nur sehr wenige solcher Analysen durchgeführt worden. Auch hier konnte bisher kein relevanter Effekt festgestellt werden (Planas-Silva et al. 2007). Angesichts der geringen Häufigkeit von MYC-Amplifikationen insbesondere in frühen und geringgradigen Mammakarzinomen scheint es aber ohnehin zweifelhaft, dass MYC eine klinisch relevante Rolle für das Versagen der Hormontherapie spielt.

Diese Situation ist grundlegend anders für Cyclin D1. Zahlreiche Studien haben bisher den Einfluss einer Cyclin D1-Amplifikation und/oder Überexpression auf das Ansprechen einer Hormontherapie untersucht. Vor allem sechs Studien zeichnen sich dabei durch eine relativ hohe Fallzahl mit >150 Tumoren aus. Die größte Untersuchung von Rudas et al. (2008) per Immunhistochemie umfasste beinahe 1000 Patientinnen. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Studien widersprüchlich. In fünf dieser Studien wurde eine FISH oder CISH-Analyse zur Bestimmung der Cyclin D1-Kopiezahl verwendet. Drei dieser Studien fanden die Cyclin D1-Amplifikation als einen unabhängigen Prognosefaktor für das Versagen einer Tamoxifen-Therapie. Die restlichen zwei Studien konnten zwar in einer univariaten Analyse diesen Zusammenhang bestätigen, nicht jedoch unabhängig von Tumorstadium und Grad. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse scheinen mögliche technische Gründe - wie etwa eine unterschiedliche Interpretation der FISH-Ergebnisse - jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, weil die Häufigkeit der Cyclin D1-Amplifikation sowohl zwischen den Studien (13%-20%) (Jirström et al. 2005, Elsheikh et al. 2007, Kirkegaard et al. 2008, Reis-Filho et al. 2006) als auch mit den in unserer Studie gefundenen 11% relativ gut übereinstimmt. Eine genauere Analyse der Studien zeigt jedoch deutliche Unterschiede in den Patientenkollektiven. So fällt auf, dass in den Studien, die eine unabhängige Prognoserelevanz der Cyclin D1-Amplifikation für das Ansprechen auf die Tamoxifen-Therapie finden, die

Patienten fast ausschließlich mit einer Hormontherapie behandelt worden sind, ohne dass eine Chemotherapie angeschlossen wurde. Zum Beispiel finden sich in der Studie von Jirström et al. (2005) nur etwa 2% der Patienten, die zusätzlich zur Tamoxifen-Therapie noch eine Chemotherapie erhalten haben. In der Studie von El-Sheikh et al. (2008) ist keinerlei Chemotherapie erwähnt. In der Studie von Petrakova et al. (2008) wird zwar nicht explizit gesagt, welche Fraktion der Patienten noch eine zusätzliche Chemotherapie erhalten hat. Allerdings wird erwähnt, dass die gefundene unabhängige Prognoserelevanz von Cyclin D1 nur für die Tamoxifen-monotherapierte Gruppe gilt und nicht für die Patienten, die eine zusätzliche Chemotherapie erhalten hatten. Auch in der großen Studie von Rudas, in der sich in der Immunhistochemie CCND1 als unabhängiger Prognosefaktor nachweisen ließ, findet sich kein Hinweis auf eine Behandlung mit Chemotherapie (Rudas et al. 2008).

Diese Studien lassen die Hypothese zu, dass die widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf den prädiktiven Wert einer Cyclin D1-Amplifikation auf den Profit von einer Hormontherapie bei Mammakarzinomen offensichtlich stark durch die zusätzlichen verwendeten Therapieformen beeinflusst wird. Es ist denkbar, dass die Cyclin D1-Amplifikation eine etwas aggressivere Form des Mammakarzinoms bedingt, die durch eine zumindest beginnende generelle genetische Instabilität gekennzeichnet ist. Solche Tumoren könnten potenziell besonders gut von einer Chemotherapie profitieren, die vor allem auf rasch proliferierende Zellen wirkt. In Patienten, die zusätzlich zur Hormontherapie eine solche zytotoxische Therapie erhalten haben, könnte der mögliche prädiktive Effekt einer Cyclin D1-Amplifikation daher vielleicht nicht mehr deutlich zu erkennen sein. Für diese Hypothese spricht, dass zwei Studien mit FISH, die keine unabhängige Prognoserelevanz für Cyclin D1 gefunden haben, einräumen, zumindest in einem gewissen aber nicht näher definierten Teil der Patienten zusätzlich eine Chemotherapie gegeben zu haben (Kirkegaard et al. 2008, Reis-Filho et al. 2006). Um diesen möglichen Einfluss einer Misch-Therapie besser zu beurteilen, haben wir die Analyse in unserem Kollektiv noch einmal wiederholt. Wir konzentrierten uns auf das 293 Fälle umfassende Subset der Patienten, bei

dem wir mit ziemlicher Sicherheit davon ausgehen können, dass sie lediglich eine Tamoxifen-Monotherapie ohne zusätzliche Chemotherapie erhalten haben. Es zeigte sich kein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen amplifizierten und normalen Tumoren. Allerdings war die Zahl der Ereignisse in diesem Subset möglicherweise zu gering für eine statistisch sinnvolle Analyse: Nur 24 Patienten von den insgesamt 293 Patienten dieser Gruppe hatten ein Rezidiv.

Außerdem bleibt fraglich, ob aus rein tumorbiologischer Sicht ein Zusammenhang zwischen einer Cyclin D1-Überexpression und einem verminderten Ansprechen auf Hormontherapie überhaupt Sinn macht.

Würde es einen funktionell relevanten Einfluss explizit des Cyclin D geben, so wäre zu erwarten, dass die Überexpression des Proteins unabhängig von dem Genkopiezahlstatus einen solchen Effekt widerspiegeln würde. Auch hier sind die publizierten Daten allerdings widersprüchlich. So deutet die Studie von Jirström et al. (2005) darauf hin, dass die unabhängige Prognoserelevanz möglicherweise nur für das Vorliegen einer Cyclin D1-Amplifikation, aber nicht einer Überexpression ohne gleichzeitige Amplifikation gilt. In dieser Studie zeigten 15 % eine Cyclin D1-Amplifikation. Die erhöhte Genkopiezahl war signifikant mit einer Proteinexpression assoziiert. Die unabhängige Prognoserelevanz zeigte sich nur in der kleinen Gruppe der amplifizierten Tumoren und nicht in der großen mit einer alleinigen Proteinüberexpression. Dieser Befund deutet darauf hin, dass weniger die Effekte des Genprodukts, sondern möglicherweise eine mit der Amplifikation einhergehende genetische Veränderung und Instabilität zu dem aggressiveren Verhalten der Tumorzellen geführt haben könnte (siehe unten).

Zumindest in Zellkultur-Experimenten ist jedoch auch ein Zusammenhang zwischen der Cyclin D1-Überexpression und Tamoxifen-Resistenz beschrieben (Wilcken et al. 1997, Kilker et al. 2006, Hui et al. 2002). Die verwendeten Zelllinien (human breast cancer cells, MCF-7 cells, human breast cancer cells) gelten zwar als CCND1-Amplifikations-negativ, allerdings ist in diesen Studien

der CCND1-Genstatus nicht untersucht worden, sodass nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass nicht doch eine CCND1-Amplifikation in den untersuchten Zelllinien vorlag. Zudem sind diese Studien rein deskriptiv und bleiben eine plausible Erklärung schuldig, warum die CCND1 Expression biologisch sinnvollerweise zur Resistenz führen könnte. Zwar postulieren Zwijsen et al. (1997), dass eine Überexpression von Cyclin D1 die transkriptionale Aktivität des Östrogenrezeptors stimuliert. Dies geschieht gemäß den Autoren sogar unabhängig von einer Komplexbildung mit einer Cyclin abhängigen Kinase und konnte durch Tamoxifen nicht verhindert werden.

Allerdings wird dieses Erklärungsmodell in einer darauffolgenden Studie nicht bestätigt. Vielmehr vermuten Pacilio et al. (1998), dass eine CCND1 Überexpression zwar Einfluss nimmt auf die frühen Zellzyklus-Effekte der Antiöstrogene, dieser Einfluss aber nicht ausreicht, um den zytostatischen Effekt von Tamoxifen zu verhindern. Dieses Ergebnis würde demnach gegen eine biologisch sinnvolle, CCND1 Protein-vermittelte Tamoxifen-Resistenz sprechen.

Neue Erklärungsansätze kommen aus einer Studie von Ishii et al. (2008). Laut dieser Studie könnte die Resistenz mit der Interaktion zwischen CCND1 und STAT 3 zusammenhängen. STAT 3 ist der antiapoptotisch wirkende Transkriptionsfaktor „Factor Signal Transducer and Activator of Transcription 3“ (STAT3). CCND1 kann an STAT3 binden und auf diese Weise den antiapoptotischen Effekt von STAT3 hemmen. Cyclin D1 wirkt dadurch indirekt proapoptotisch (und somit auch antiproliferativ) (Ishii et al. 2006). Laut Ishii ist jedoch normalerweise der über STAT3 vermittelte proapoptotische Effekt von CCND1 nur schwach ausgeprägt. Ishii et al. fanden bei der Analyse von Zelllinien, dass CCND1 - zumindest in Anwesenheit von Tamoxifen - bevorzugt an den Östrogenrezeptor bindet und nicht mehr an STAT 3. Somit fällt die antiapoptotische Hemmung von STAT3 weg und ruft auf diese Weise eine gesteigerte Proliferation, gleichbedeutend mit einer Resistenz gegen Tamoxifen, hervor.

Diese Befunde sind jedoch bisher in keiner anderen Studie bestätigt worden. Ishii et al. selbst führen v.a. zwei klinische Studien von Jirström et al. (2005) und

Stendahl et al. (2004) als indirekte Unterstützung ihrer Hypothese an, weil sich laut Ishii in beiden Studien in Tamoxifen- unbehandelten Patientinnen ein prognostischer Vorteil für CCND1 positive Patientinnen zeigte. Dies würde die These von Ishii, dass Cyclin D1 in Abwesenheit von Tamoxifen proapoptotisch und somit antiproliferativ wirkt, klinisch stützen.

Wie oben bereits angeführt, findet aber Jirström zwar für CCND1 Amplifikationen, aber eben nicht für die Proteinexpression einen unabhängigen prognostischen Wert. Jirström schlussfolgert sogar, dass aufgrund dieses Ergebnisses das Cyclin D1 Protein nicht primär in Verbindung steht mit einer veränderten Antwort auf Tamoxifen - was die Hypothese einer direkten Interaktion zwischen STAT3, CCND1 und ER eben nicht unterstützt. Daher stellt die Studie von Jirström nicht nur keinen Beleg für die experimentellen Daten von Ishii dar, sie widerspricht diesen sogar.

Die Studie von Stehdahl et al., auf die sich Ishii bezieht, findet unter unbehandelten Patientinnen tatsächlich einen Überlebensvorteil von CCND1 überexprimierenden Tumoren. Dabei ist zu bedenken, dass es sich hierbei um ein sehr kleines Kollektiv von 55 Patienten handelte. Darüber hinaus konnte in dieser Studie die CCND1 Expression ebenfalls nicht als unabhängiger Prognosefaktor etabliert werden.

Deshalb kann die Richtigkeit von Ishiis (Ishii et al. 2008) Modell aufgrund der schwachen klinischen Datenlage nicht zufriedenstellend geklärt werden, auch wenn es biologisch durchaus plausibel erscheint.

Alternativ zu einer direkten Interaktion zwischen CCND1 und ER/Tamoxifen ist auch denkbar, dass Amplifikationen ein Subset von genetisch instabilen Tumoren charakterisierten, das generell durch eine ungünstige Prognose und daher auch scheinbar vermindertes Ansprechen auf eine Hormon-Therapie gekennzeichnet ist. So deuten Choschzick et al. (2010) an, dass zumindest ein Teil der Tumoren mit CCND1 Amplifikation zu einem Subtyp mit besonders großer genomischer Instabilität zählt. Die Autoren konnten für diesen so genannten „Amplifier Phenotype“ zeigen, dass eine Amplifikation des Amplikons

8q21 mit einer zweifach erhöhten Wahrscheinlichkeit einhergeht, auch weitere Amplifikationen zu entwickeln. Diese Studie zeigte auch, dass die reine Anzahl der Amplifikationen je Tumor prognoserelevant ist: Je mehr Amplifikationen, desto schlechter die Prognose. Diese Schlussfolgerungen werden gestützt durch die Ergebnisse von Al-Kuraya et al. (2004). Im Rahmen dieser Studie wurden mehr als 1700 Tumoren auf Amplifikationen von CCND1, HER2, MYC, MDM2 und EGFR- untersucht. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass Koamplifikationen häufiger auftraten als es die Anzahl der einzelnen Amplifikationen hätte vermuten lassen und dass die Anzahl der Amplifikationen mit der Patientenprognose korreliert.

Zwar war die Anzahl der Tumoren mit mehr als einer Amplifikation in der vorliegenden Studie zu gering (n=3), um einen solchen Zusammenhang zu zeigen. Jedoch spricht die Tatsache, dass alle untersuchten Genamplifikationen mit fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren assoziiert waren, stark dafür, dass bei einer größeren Fallzahl ein ähnlicher Effekt auch hier feststellbar wäre.

Zusammenfassend belegen die Daten der aktuellen Studie, dass Genamplifikationen von CCND1, HER2 und MYC mit entdifferenzierten Tumoren und einer ungünstigen Prognose einhergehen. Eine unabhängige Prognoserelevanz der CCND1-Amplifikation, gleichbedeutend mit einem prädiktiven klinischen Wert zur Vorhersage des Versagens einer Tamoxifen-Therapie, konnte jedoch nicht belegt werden. Es scheint vielmehr möglich, dass Genamplifikationen ein Subset von besonders aggressiven Tumoren charakterisieren, das generell weniger gut von einer reinen Hormontherapie profitiert.

5. Zusammenfassung

Die anti-hormonelle Therapie mit Inhibitoren des ER (z.B. Tamoxifen) oder der Östrogen-Synthese ist neben der chirurgischen Tumorresektion die wichtigste Behandlungsform des Mammakarzinoms. Allerdings sprechen nicht alle Patientinnen mit ER-positiven Tumoren gleich gut an. Es wird vermutet, dass Amplifikationen u.a. des Onkogens CCND1 eine wichtige Ursache für diese Resistenz sein könnte. Die Studienlage hierzu ist aber bisher widersprüchlich.

Wir untersuchten 516 Brustkrebspatientinnen, die als endokrine Therapie lediglich Tamoxifen erhalten hatten. Zusätzlich zu Tamoxifen erhielten 149 Patientinnen eine adjuvante (Poly-)chemotherapie. Von den Patientinnen wurde ein Gewebe-Microarray erstellt. Das Gewebe der Patientinnen wurde mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Amplifikationen von HER2, MYC und CCND1 untersucht. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Untersuchung von HER2 durchgeführt. Von den Patientinnen wurden klinische Follow-Up Daten erstellt. Als Studienendpunkt wurde ein Rezidiv unter Tamoxifen-Therapie festgesetzt.

Es zeigten sich folgende Amplifikationshäufigkeiten: HER2 (6,5%), CCND1 (11,4%), MYC (2,5%). HER2 Amplifikationen waren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0.0001$), hohem Malignitätsgrad ($p < 0.0001$), positivem Nodalstatus ($p < 0.0001$) und einem negativen ER-Status ($p < 0.0001$) assoziiert. MYC Amplifikationen waren mit dem Malignitätsgrad assoziiert ($p = 0.019$). CCND1 Amplifikationen waren mit keinem pathologischen Parameter assoziiert. Es zeigte sich in der uni- aber nicht in der multivariaten Analyse, dass sowohl HER2 Amplifikationen als auch CCND1 Amplifikationen mit einem früheren Rezidiv unter der Tamoxifen Therapie assoziiert sind.

Die Ergebnisse der Studie lassen die Schlussfolgerung zu, dass Amplifikationen von HER2, MYC oder CCND1 keinen unabhängigen prädiktiven Wert für das Ansprechen oder Versagen einer Tamoxifen-Therapie haben. Vielmehr charakterisieren Genamplifikationen ein Subset von besonders aggressiven Tumoren, die generell weniger gut von einer Hormontherapie profitieren.

6. Literaturverzeichnis

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Köchli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8534-40.

Andersen J, Poulsen HS. Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. *Cancer.* 1989 Nov 1;64(9):1901-8.

Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA. C-MYC amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:1107-13.

Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, van Putten WL, de Koning HY, Portengen H, Klijn JG. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene.* 1995 Jun 14; 159(1):11-8.

Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, Budman DR, Henderson IC, Barcos M, Hayes D, Norton L. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000 Oct 15; 18(20):3471-9.

Bizari L, Borim AA, Leite KR, Gonçalves Fde T, Cury PM, Tajara EH, Silva AE. Alterations of the CCND1 and HER2/neu (ERBB2) proteins in esophageal and gastric cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006 Feb;165(1):41-50.

Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove EA, Sutherland RL. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene.* 1993 Aug;8(8):2127-33.

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol.* 1996 Oct;14(10):2702-8.

Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkötter U, Jaenicke F, Bokemeyer C, Izbicki J, Sauter G, Simon R. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol.* 2010 Apr;23(4):603-10.

Chustecka Z. Survival Advantage for Anastrozole vs Tamoxifen in Breast Cancer. *Lancet Oncol.* Published online November 17, 2006.

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001 Jan 25;344(4):276-85.

Climent MA, Seguí MA, Peiró G, Molina R, Lerma E, Ojeda B, López-López JJ, Alonso C. Prognostic value of HER-2/neu and p53 expression in node-positive breast cancer. HER-2/neu effect on adjuvant tamoxifen treatment. *Breast.* 2001 Feb;10(1):67-77.

Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Culine S, Theillet C. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):1077-83.

De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, D'Agostino D, Caputo F, Cancellato G, Montagna E, Malorni L, Zinno L, Lauria R, Bianco AR, De Placido S. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 1;11(13):4741-8.

Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-MYC amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000; 83:1688-95

Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Annals of Oncology* 2006 17(5):818-826;

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group; Adjuvant polychemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: meta-analysis of individual patient data from the randomised trials. [Online im Internet.] URL: <http://www.ctsu.ox.ac.uk/~ebctcg/draft8oct2007.pdf>. [Stand: 10.07.2009, 15:15].

Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, et al. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997;72:608-13.

Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(2):325-35.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. IARC CancerBase No. 5 - Globocan 2000, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, International Agency for Research on Cancer Lyon 2001 (Updated 2002).

Ferrero-Poüs M, Hacène K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4745-54.

Fisher B, Gebhardt MC. The evolution of breast cancer surgery: past, present and future. *Semin Oncol* 1978; 5: 385-394.

Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, Smith R, Begovic M, Dimitrov NV, Margolese RG, Kardinal CG, Kavanah MT, Fehrenbacher L, Oishi RH. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet.* 1999; 353(9169):1993-2000.

Gardner L, Lee L, Dang C. The c-MYC Oncogenic Transcription Factor The Encyclopedia of Cancer, Second Edition, July 2002. [Online im Internet.] URL: <http://www.MYCcancergene.org/documents/MYCReview.pdf> [Stand: 10.07.2009, 15:15].

Giersiepen K, Heitmann C, Janhsen K, Lange C. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25 Brustkrebs, Robert Koch-Insitut, Berlin 2005.

Gillett C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D, Peters G. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. Clinical Oncology Unit, Guy's Hospital, London, United Kingdom. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1812-7.

Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007;608: 1-22.

Gullick WJ. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: alternative strategies for targeting the epidermal growth factor system in cancer. *Breast Cancer Res.* 2001.

Héry C, Ferlay J, Boniol M, Autier P. Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations. *Annals of Oncology*, 2008 May; 19(5):1009-18.

Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:974-84.

Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1999 Mar; 79(7-8):1220-6.

Howell A, Cuzick J, Baum M, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365 (9453): 60–2. 2005.

Hui R, Finney GL, Carroll JS, Lee CS, Musgrove EA, Sutherland RL. Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res*. 2002 Dec 1; 62(23):6916-23.

Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 30; 1198(2-3):165-84.

Ishii Y, Pirkmaier A, Alvarez JV, et al. Cyclin D1 overexpression and response to bortezomib treatment in a breast cancer model. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1238–47.

Ishii Y, Waxman S, Germain D. Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res*. 2008 Feb 1; 68(3):852-60.

Janni W, et al.: Zertifizierte medizinische Fortbildung: Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2005; 102(41): A-2795 / B-2360 / C-2226.

Jirström K, Stendahl M, Rydén L, Kronblad A, Bendahl PO, Stål O, Landberg G. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res*. 2005 Sep 1; 65(17):8009-16.

Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, Sutherland RL, Robertson JF. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for

poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug;5(8):2069-76.

Kilker RL, Hartl MW, Rutherford TM, Planas-Silva MD. Cyclin D1 expression is dependent on estrogen receptor function in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Sep;92(1-2):63-71.

Kilker RL, Planas-Silva MD. Cyclin D1 is necessary for tamoxifen-induced cell cycle progression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11478-84.

Kirkegaard T, Nielsen KV, Jensen LB, Campbell FM, Müller S, Tovey SM, Brown S, Cooke TG, Bartlett JM. Genetic alterations of CCND1 and EMSY in breast cancers. *Histopathology.* 2008 May;52(6):698-705.

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* 1988 Jan 25;16(2):647-63.

Knoop AS, Bentzen SM, Nielsen MM, Rasmussen BB, Rose C. Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001 Jul 15;19(14):3376-84.

Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell.* 1988 Oct 7;55(1):145-56.

Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000 Oct 15;60(20):5887-94.

Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):1978-83.

Naidu R, Wahab NA, Yadav MM, Kutty MK. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters. *Oncol Rep* 2002;9:409-16.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Breast cancer: treatment guidelines for patients. American Cancer Society & National Comprehensive Cancer Network Guidelines, version V. NCCN American Cancer Society, 2003.

Neuman E, MH Ladha, N Lin, TM Upton, SJ Miller, J DiRenzo, RG Pestell, PW Hinds, SF Dowdy, M Brown and ME Ewen. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol. Cell. Biol.*, 09 1997, 5338-5347, Vol 17, No. 9

Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001. 3 (6): 385–389.

Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:1609-18.

Pacilio C, Germano D, Addeo R, Altucci L, Petrizzi VB, Cancemi M, Cicatiello L, Salzano S, Lallemand F, Michalides RJ, Bresciani F, Weisz A. Constitutive overexpression of cyclin D1 does not prevent inhibition of hormone-responsive human breast cancer cell growth by antiestrogens. *Cancer Res.* 1998 Mar 1;58(5):871-6.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene.* 1996 Jul 4;13(1):63-72.

Petráková K, Nenutil R, Grell P, Fabian P, Zichová I, Svoboda M, Palácová M, Vyzula R. Factors predicting failure of adjuvant hormone therapy of breast carcinoma. A study in tamoxifen treated patients. *Klin Onkol.* 2008; 21(5):303-8.

Planas-Silva MD, Bruggeman RD, Grenko RT, Smith JS. Overexpression of c-MYC and Bcl-2 during progression and distant metastasis of hormone-treated breast cancer. *Exp Mol Pathol.* 2007 Feb;82(1):85-90.

Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL, Dowsett M. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod Pathol.* 2006 Jul;19(7):999-1009.

Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -mechanisms of action and application to clinical practice. *N. Engl. J. Med.* 2003 Bd. 348, S. 618-629.

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003;8(4):307-25.

Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest.* 2001;19(5):554-68.

Ross JS, Yang F, Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Muraca PJ. HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol.* 1999 Mar;111(3):311-6.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009 Apr;14(4):320-68.

Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, Lax S, Schippinger W, Dietze O, Greil R, Stiglbauer W, Kwasny W, Grill R, Stierer M, Gnant MF, Filipits M. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 15;14(6):1767-74.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103:211–225.

Seshadri R, Lee CS, Hui R, McCaul K, Horsfall DJ, Sutherland RL. Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. *Clin Cancer Res* 1996;2:1177-84.

Spyratus F, Andrieu C, Vidaud D, Briffod M, Vidaud M, Lidereau R, Bieche I. CCND1 mRNA overexpression is highly related to estrogen receptor positivity but not to proliferative markers in primary breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2000 Jul-Sep;15(3):210-4.

Stendahl M, Kronblad A, Rydén L, Emdin S, Bengtsson NO, Landberg G. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2004 May 17;90(10):1942-8.

- Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tüchler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg.* 1993 Jul;218(1):13-21.
- Sunderland MC, McGuire WL. Hormones and breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 1991 Mar-Apr;2(2):72-6.
- Swain SM. Tamoxifen and contralateral breast cancer: the other side. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jul 4;93(13):963-5.
- Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S, Beck A, Sait S, Anderson T, Nwogu C, Ramnath N, Loewen G. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 2003 Dec;12(4):201-11.
- Travis K. Bernard Fisher reflects on a half-Century's worth of breast cancer research. *Journal of the National Cancer Institute* 2005 (97):1636-7.
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer.* 2007 Aug 8; 7:153.
- Wilcken NR, Prall OW, Musgrove EA, Sutherland RL. Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens. *Clin Cancer Res.* 1997 Jun;3(6):849-54.
- Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1992 Jan;65(1):118-21.
- Zwijssen RM, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):405-15.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank für die sehr gute Zusammenarbeit gilt dem Betreuer meiner Promotionsarbeit, Herrn Privatdozent Dr. Ronald Simon sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Guido Sauter. Sie gaben mir bei der Bearbeitung des Themas wichtige gedankliche Anstöße. Ich danke Herrn Doktor Simon außerdem für die abschließende Durchsicht.

Desweiteren danke ich den Mitarbeitern der Brustklinik im Krankenhaus Jerusalem, Hamburg sowie dem Röntgenzentrum Hamburg. Ohne die freundliche, kollegiale Unterstützung und Zusammenarbeit wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

8. Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

9. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: