

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Stanzylinder Tissue Microarrays zur Identifikation prädiktiver
Marker an Leberstanzbiopsien**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Daria Katharina Dekassian
aus Kufstein

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.07.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. J.R. Izbicki

Für meine Großmutter
Maria Dekassian

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	5
2	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Patientenkollektiv	13
3.2	Histologie Review & Befunde.....	13
3.3	Zusammenstellung der Tissue Microarrays (TMA)	14
3.4	Herstellung der Tissue Microarrays	26
3.5	Immunhistochemie (IHC).....	28
3.6	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	29
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Auswertbarkeit der Lebermetastasen-Arrays	31
4.2	HER2 Veränderungen in Lebermetastasen-Arrays	34
4.2.1	HER2 Expression	34
4.2.2	HER2 FISH-Signale	36
4.2.3	HER2 Expression und Amplifikation im Vergleich.....	37
4.3	KIT (CD117) Expression in Lebermetastasen-Arrays	38
4.4	EGFR FISH-Signale in Lebermetastasen-Arrays.....	40
5	Diskussion	41
6	Zusammenfassung	49
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	52
8	Abkürzungsverzeichnis	53
9	Literaturverzeichnis	55
10	Danksagung.....	69
11	Lebenslauf	70
12	Eidesstattliche Erklärung	71

1 Einleitung

Im Jahr 2006 wurden in Europa über 3,1 Millionen Krebs-Neuerkrankungen festgestellt und mehr als 1,7 Millionen Menschen, davon 56% Männer und 44% Frauen, erlagen ihrem Krebsleiden. Beim männlichen Geschlecht stellte das Lungenkarzinom (26,6%) die häufigste Krebstodesursache dar, während bei Frauen das Mammakarzinom (17,6%) den größten Anteil der durch Krebs verursachten Todesfälle bildete (Ferlay et al., 2007). Die überwiegende Mehrzahl der Tumorpatienten versterben aufgrund der Entwicklung von Metastasen (Eccles et Welch, 2007).

Bis vor knapp zehn Jahren stützte sich die Tumorthherapie auf drei Säulen: die Chirurgie, die Strahlentherapie und die zytostatische Chemotherapie. Eine definitive Heilung im Bereich der soliden Tumore versprach meist nur eine vollständige Entfernung des Tumors durch den Chirurgen (Stenner-Liewen et al., 2006) oder die Zerstörung des Tumors durch Radiotherapie (Pisansky et al., 2008). Klassische Chemotherapeutika stören verschiedene Aspekte der DNA-Synthese und Reparatur oder beeinträchtigen die Mitose. Da dies allen sich teilenden Zellen gemein ist, sind die meisten Zytostatika mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden (Zhang et al., 2007). In den letzten Jahren wurden im Bereich der Krebstherapie viele neue Strategien entwickelt, die gezielt spezifische Krebsignalwege und Schlüsselmoleküle des Tumorwachstums und der Tumorprogression hemmen. Bedeutende Fortschritte sind besonders bei der Inhibition von Tyrosinkinase, ihrer Liganden und bei Komponenten der Signaltransduktion erreicht worden (Baselga et Arteaga, 2005).

EGFR und HER2 gehören zur Rezeptor-Tyrosinkinase-Superfamilie, die sich in vier Subgruppen unterteilt: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Reid et al., 2007).

EGFR ist in vielen epithelialen Tumoren exprimiert (Grimm et al., 2005). Ob die EGFR-Expression in den verschiedenen Tumoren eine prädiktive Aussagekraft für das Ansprechen einer Anti-EGFR-Therapie darstellt, ist derzeit allerdings unklar. Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC), die auf eine Tyrosinkinase-

inhibitoren-Therapie ansprechen, weisen oft verschiedene Mutationen im EGFR-Gen auf. Am häufigsten nachgewiesen sind aktivierende Mutationen innerhalb des Exon 18 bis 21. Punktmutationen im Exon 21 (L858R) sowie Deletionen im Exon 19 (del E746-T751) stellen prädiktive Marker für zugelassene Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Erlotinib und Gefitinib, dar (Ono et Kuwano, 2006). Zudem spielt die Existenz der EGFR-Genzunahme möglicherweise eine kritische Rolle für die Effizienz dieser Medikamente. Auch Cappuzzo et al. (2005) berichteten, dass Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) und einem FISH-positiven EGFR-Status (hohe Polysomie oder Genamplifikation) eine höhere Ansprechrates und längere Dauer der Tumoremision und Überlebenszeit aufweisen als FISH-negative Patienten. Nicholson et al. (2001) evaluierten über 200 Studien aus den Jahren 1985 bis 2000 und zeigten, dass die EGFR-Expression bei manchen Tumoren, darunter Kopf-/Hals-, Ovarial-, Zervix-, Harnblasen- und Ösophaguskarzinome, von hoher prognostischer Bedeutung ist. In Magen-, Brust-, Endometrium- und colorektalen Karzinomen war der EGFR-Status hingegen nur von mäßigem prognostischem Wert und bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) ließen sich dazu kaum Aussagen treffen.

Verschiedene Medikamente haben sich gegen den EGFR effektiv gezeigt:

Cetuximab (C225, Erbitux ®) ist ein chimärer monoklonaler Antikörper. Er wurde 2004 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit Irinotecan für die Therapie EGFR-positiver metastasierender colorektaler Karzinome (CRC) zugelassen. 2005 folgte dann die Zulassung für bisher unbehandelte squamöse Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Hals-Bereichs (SCCHN) in Kombination mit Radiotherapie durch die Schweizer Swissmedic-Kommission (Marshall, 2006). Des Weiteren befindet sich Cetuximab in klinischen Phase II und III Studien für Brust-, Endometrium-, Magen-, Nieren-, Ovarial-, Pankreas-, Zervix- und hepatozellulären Karzinome (Rocha-Lima et al., 2007).

Erlotinib (Tarceva ®) ist ein reversibler Tyrosinkinaseinhibitor, der oral verabreicht wird. Bereits 2004 wurde er für die Therapie von lokal fortgeschrittenen oder metastasierenden nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zugelassen. 2005

erfolgte dann auch die Therapiezulassung als first-line Behandlung in Kombination mit Gemcitabin bei fortgeschrittenen, inoperablen oder metastasierenden Pankreaskarzinomen (Marshall, 2006). Weitere Therapieerfolge werden derzeit auch in klinischen Phase II und III Studien bei Brust-, Kopf-/Hals-, Ovarial-, Prostata-, colorektalen Karzinomen und dem Glioblastom multiforme evaluiert (Rocha-Lima et al., 2007).

Gefitinib (Iressa ®) ist ebenfalls ein Tyrosinkinaseinhibitor. Ursprünglich wurde er 2003 für die Monotherapie von fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zugelassen. Dies wurde allerdings widerrufen, nachdem zwei Studien (ISEL und S0023) bei den behandelten Patienten enttäuschenderweise keine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit nachweisen konnten (Marshall, 2006). Im Moment ist das Medikament nur bei Patienten indiziert, die bereits von einer Gefitinib-Therapie profitiert haben. Zudem finden derzeit auch verschiedene klinische Phase II und III Studien statt, um den Therapieerfolg bei Brust-, Harnblasen-, Kopf-/ Hals-, Ösophagus-, Prostata- und colorektalen Karzinomen zu testen (Rocha-Lima et al., 2007).

HER2 ist bei 15-30% der Mammakarzinome überexprimiert und amplifiziert (Piccart-Gebhart et al., 2005; Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989). Beide Veränderungen werden mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebensdauer assoziiert, einem fehlenden Ansprechen auf eine Tamoxifen-Antiöstrogentherapie sowie einem veränderten Ansprechen auf viele zytostatische Chemotherapien (Press et al., 2005). Tapia et al. (2007) berichteten in einer kürzlich veröffentlichten Studie über die hohe Konkordanz zwischen HER2-Überexpression und HER2-Amplifikation in verschiedenen Tumoren. So waren 91,4% der stark positiven (3+) Mammakarzinome auch HER2-amplifiziert. Bei Karzinomen anderer Entitäten konnte sogar in 100% der stark positiven (3+) Fälle eine HER2-Amplifikation nachgewiesen werden. Eine besonders große Übereinstimmung fand sich vor allem bei Harnblasen-, Magen-, Endometrium-, Lungen- und Ovarialkarzinomen.

Trastuzumab (Herceptin ®) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der 1998 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von HER2-positiven metastasierenden Mammakarzinomen zugelassen

wurde (Press et al., 2005). Trastuzumab zeigt sich hier sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika effektiv (Meric-Bernstam et al., 2006). Kürzliche Studien haben gezeigt, dass Trastuzumab auch als adjuvantes Medikament zu einer drastischen Reduktion (um die 50%) von Rezidiven und Mortalität führt (Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005). In einer weiteren Studie wurde der Einsatz von Trastuzumab als Neoadjuvans in Kombination mit Chemotherapie bei HER2-positiven operablen Mammakarzinomen getestet. Dies führte bei 65% der Patienten zu einer signifikanten pathologischen Komplettremission, die bei alleiniger Chemotherapie nur von 26% der Patientinnen erreicht werden konnte (Buzdar et al., 2005).

KIT (CD117) ist eine Typ 3-Rezeptor-Tyrosinkinase und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Melanozyten, Keimzellen, Mastzellen, hämatopoetischen Stammzellen und den interstitiellen Cajalzellen. Bei 85% der gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) werden aktivierende KIT-Mutationen nachgewiesen. Die meisten davon (70%) entstehen in der juxtamembranösen Domäne des Exon 11 (Hornick et Fletcher, 2007). Von herausragender diagnostischer Bedeutung ist der Nachweis einer KIT-Expression bei GIST. Ungefähr 95% der Fälle sind immunhistochemisch CD117 positiv (Dirnhofer et al., 2006). Andere Karzinome, die mit KIT-Überexpression in Verbindung gebracht werden, sind Seminome, adenoid-zystische Karzinome, maligne Melanome und großzellige Lungenkarzinome (Went et al., 2004).

Imatinib (STI571/Glivec ®) wurde als das „Vorbild der Targeted Therapy“ (Druker, 2004) bezeichnet, da es eine völlig neue molekulare Herangehensweise bei der Behandlung von BCL/ABL-, PDGFR- und KIT- mutierten malignen Erkrankungen repräsentierte (Orfao et al., 2007). Ursprünglich wurde dieses Medikament zur Therapie chronisch myeloischer Leukämien eingesetzt und zeigte sich dort - durch die gezielte Hemmung des BCL/ABL-Fusionssproteins - äußerst effektiv. Erst später stellte sich heraus, dass das Medikament auch bei KIT-exprimierenden gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) mit großem Erfolg appliziert werden kann (Went et al., 2004). Mehr als 80% der Patienten mit metastasierenden gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) profitieren von einer Behandlung, entweder durch partielles Ansprechen oder

durch Krankheitsstabilisierung (Demetri et al., 2002; Verweij et al., 2004). Zudem korreliert die Wirksamkeit von Imatinib mit dem jeweiligen Genotyp des Tumors, wobei gastrointestinale Stromatumoren (GIST) mit KIT-Mutationen im Exon 11 die höchsten Ansprechraten aufweisen (Rubin et al., 2007).

Die beschriebenen Krebsmedikamente haben gemeinsam, dass sie nur bei Tumoren mit bestimmten molekularen Veränderungen wirksam sind. So hemmt Trastuzumab das Zellwachstum nur bei HER2-positiven Tumoren, während sich das Medikament bei HER2-negativen Mammatumoren als nicht wirksam erwies (Ferretti et al., 2007). Auch der Therapieerfolg von Imatinib korreliert in hohem Maße mit der Präsenz und der jeweiligen Lokalisation von KIT-Mutationen (Heinrich et al., 2003; Debiec-Rychter et al., 2004). Etwas komplizierter verhält sich die Situation bei Anti-EGFR-Medikamenten. Studien konnten keine Korrelation zwischen EGFR-Expression und Cetuximab-Sensitivität bei Patienten mit metastasierenden colorektalen Karzinomen feststellen (Cunningham et al., 2004; Lenz et al., 2006). Paradoxerweise zeigte sich, dass auch EGFR-negative Patienten auf eine Cetuximab-Therapie ansprachen (Chung et al., 2005; Lenz et al., 2006). Auch bei der Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) wurde kein prädiktiver Wert der EGFR-Expressionshöhe für das Ansprechen auf die Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib festgestellt (Pérez-Soler et al., 2004; Parra et al., 2004). Allerdings zeigten verschiedene Studien eine bedeutende Assoziation zwischen einer hohen EGFR-Genkopiezahl und dem Ansprechen auf eine Gefitinib-Therapie (Cappuzzo et al., 2005; Tsao et al., 2005; Hirsch et al., 2005).

Im Gegensatz zu den klassischen Krebs-Chemotherapeutika ist es deswegen für den Einsatz gezielter Krebsmedikamente notwendig, die Therapieindikation durch eine molekulare Untersuchung von Tumorgewebe zu stellen. Typischerweise wird diese Indikation nach der Untersuchung von Primärtumoren gestellt (Gancberg et al., 2002; Sauter et al., 2003). Dies hat mehrere konzeptuelle und praktische Nachteile: Erstens ist der molekulare Status von Metastasen (die behandelt werden sollen) nicht immer identisch mit dem molekularen Befund in den Primärtumoren (die typischerweise für die molekulare Diagnostik zur Verfügung stehen). So berichteten verschiedene Studien, die den HER2-Status von Primärkarzinomen der Mamma und ihren zugehörigen

Metastasen anhand Immunhistochemie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung evaluierten, von einer fehlenden Übereinstimmung des molekularen Status in 0 – 20% der Fälle (Tapia et al., 2007; Edgerton et al., 2003; Gancberg et al., 2002; Simon et al., 2001; Tanner et al., 2001). Zweitens kann es sein, dass im Primärtumor ein heterogener Befund besteht, mit Zielgen-alterierten und Zielgen-nicht-alterierten Tumorarealen (Cottu et al., 2008; Simon et al., 2001). In diesen Fällen ist unklar, welcher Klon letztlich metastasiert ist. Drittens besteht häufig das praktische Problem, dass von Patienten, die sich jetzt mit Metastasen vorstellen, die früher untersuchten Primärtumore nicht aufbewahrt worden sind und so für eine molekulare Diagnostik nicht mehr zur Verfügung stehen.

Wünschenswert für die Therapieindikation wäre aus den oben genannten Gründen eine molekulare Untersuchung von Metastasen. Diese gestaltet sich aus Materialmangel häufig schwierig (Bozzetti et al., 2003). Falls Metastasen biopsiert werden können, werden die Biopsate oftmals mit einer dünnen Nadel entnommen, manchmal liegen auch nur zytologische Präparate vor. Nadelbiopsien sind für molekulare Analysen nicht besonders gut geeignet, da sie aufgrund der geringen Dicke der Präparate nur wenige Male angeschnitten werden können und so nach einer ersten Serie von molekularen Zusatzuntersuchungen häufig aufgebraucht sind.

Die rasche Entwicklung neuer Therapieziele und genspezifischer Medikamente führt langsam aber unaufhaltsam zu einem Paradigmenwechsel, weg von der rein organzentrierten pathologisch-histologischen Tumordefinition, hin zur molekular definierten Tumordiagnose (Schultze, 2006). Derzeit sind bereits zwei Drittel der sich in Entwicklung befindenden Substanzen den „targeted drugs“ zuzurechnen (Lengauer et al., 2005). Die Zunahme molekularer Zusatzdiagnostik stellt besonders die Institute der Pathologie vor neue Herausforderungen. Da hierfür oftmals alte Tumorblöcke in den Archiven identifiziert werden müssen, sind retrospektive Untersuchungen bereits im heutigen Umfang sehr belastend. Neue Strategien müssen gefunden werden, um zu gewährleisten, dass in Zukunft auch eine Vielzahl von Patienten schnellstmöglich auf neue Therapieoptionen getestet werden können. Eine gute Möglichkeit hierfür wäre die Sammlung und Verwaltung von kleinen Tumorgewebeteilen geeigneter Patienten in

Form von Tissue Microarrays (TMA) (Sauter et al., 2004). Die TMA-Technik erlaubt es, bis zu tausend verschiedene Gewebeproben auf einen einzigen Objektträger zu bringen und diese gleichzeitig mit in situ Methoden (Immunhistochemie, Fluoreszenz in situ Hybridisierung) zu untersuchen (Kononen et al., 1998; Bubendorf et al., 2001; Sauter et al., 2003). So könnten auch weitere diagnostische Maßnahmen, die erst nach Monaten oder Jahren möglich werden, innerhalb kürzester Zeit durchgeführt werden.

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Erst kürzlich wurde im Rahmen einer Dissertation von J. Niehaus (unveröffentlicht) am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg, ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, Tissue Microarrays (TMA) auch aus Stanzbiopsien zu generieren. Bei dieser Technik werden die diagnostisch gewonnenen Stanzzyylinder aus den ursprünglichen Blöcken herausgeschnitten und senkrecht in ein entsprechendes Loch des Empfängerblocks eingebracht. Nach der Herstellung eines derartigen Stanzzyylinder-TMAs, bestehend aus bis zu mehreren hundert Zylindern, können dann vom TMA-Block Gewebeschnitte hergestellt werden. Der große Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass das Tumorgewebe nun senkrecht im Paraffinblock steht. So können von einem Stanzzyylinder hunderte von Schnitten angefertigt werden, wodurch eine ausreichende Anzahl von molekularen Untersuchungen zu diagnostischen Zwecken ermöglicht wird.

Um die Praktikabilität dieses Verfahrens für die molekulare Charakterisierung von Metastasen-Stanzbiopsien zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Dissertation 250 Stanzbiopsien von Lebermetastasen verschiedener Entitäten mit der neuen Technik in ein TMA-Format gebracht. Anschließend erfolgte eine Untersuchung auf die Expression sowie Amplifikation der Therapieziele EGFR, HER2 und KIT, die zusammen mit dem Verfahren auch dafür geeignet ist, Tumore als mögliche Therapieziele zu erkennen, die noch nicht zu den typischen Empfängern molekularer Therapien gehören.

Zielsetzungen der vorliegenden Dissertation waren somit, die Durchführbarkeit der neu entwickelten Stanztechnik anhand von Lebermetastasen-Stanzbiopsien zu evaluieren und Aussagen darüber zu gewinnen, ob diese Methode zur Erfassung repräsentativer diagnostischer Befunde geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Um das notwendige Patientenkollektiv zusammenstellen zu können, wurden aus dem Datenarchiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf sämtliche Befunde der Patienten mit Lebermetastasen der Jahre 1993 – 2007 herausgesucht. Bei den ursprünglich circa 7900 Fällen fanden sich allerdings nur 466 als reine Stanzbiopsien. Anschließend wurden aus den Archiven die zugehörigen Gewebeschnitte und Paraffinblöcke herausgesucht. Eine Nachbeurteilung der Präparate ergab in 216 von 466 tumorehaltenden Stanzbiopsien (aufgrund schon vieler zuvor erfolgter Untersuchungen) eine zu geringe Tumormenge in den Paraffinblöcken, um das Stanzverfahren und weitere Untersuchungen durchführen zu können.

3.2 Histologie Review & Befunde

Die 250 als tauglich befundenen Gewebezylinder wurden von fünf Pathologen (E. Burandt, A. Hinsch, I. Kramme, A. Lübke und S. Minner) nachbeurteilt, wobei die Tumorareale auf den mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten genau gekennzeichnet wurden. Auch wurden jeweils die maximale Tumurlänge sowie die gesamte Tumurlänge bestimmt. Das Alter der Patienten lag zwischen 20 und 90 Jahren (Durchschnittsalter 64,03 Jahre). Das Kollektiv beinhaltete 128 Männer und 120 Frauen. Bei zwei Personen konnte das Geschlecht aufgrund ungewöhnlicher Vornamen nicht bestimmt werden. Weitere Daten wurden den Patientenakten des Instituts für Pathologie entnommen. Darunter die Lokalisation des Primärtumors, der histologische Tumortyp und das Grading nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Anschließend wurden die Tumorareale auf den Paraffinblöcken markiert und wie nachstehend beschrieben in ein Tissue Microarray-Format gebracht.

3.3 Zusammenstellung der Tissue Microarrays (TMA)

Insgesamt wurden elf verschiedene Tissue Microarray-Blöcke aus Lebermetastasen angefertigt. Die ausgewählten Stanzbiopsien wurden je nach Lokalisation des Primärtumors zusammengestellt. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben. Die Tabellen 2-12 verdeutlichen die genaue Zusammensetzung der einzelnen Lebermetastasen-Arrays. Die Abbildung 1 zeigt exemplarisch die Anordnung der einzelnen Gewebeslots auf einem Tissue Microarray.

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Lebermetastasen-Arrays

Nummer	Primärtumor (PT)	Fälle
1	Colon	38
2	Galle/Pankreas	35
3	Lunge	24
4	Mamma	38
5	Haut	10
6	Niere	04
7	Pankreas	18
8	Prostata	03
9	Urothelgewebe	11
10	Varia	19
11	Primärtumor unbekannt	50

Tabelle 2: Zusammensetzung des Colon-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Colon	Adenokarzinom	2
2	A02	Colon	Adenokarzinom	2
3	A03	Colon	Adenokarzinom	2
4	A04	Colon	Adenokarzinom	2
5	A05	Colon	Adenokarzinom	2
6	A06	Colon	Adenokarzinom	2
7	A07	Colon	Adenokarzinom	2
8	A08	Colon	Adenokarzinom	X
9	A09	Colon	Adenokarzinom	2
10	A10	Colon	Adenokarzinom	2
11	A11	Colon	Adenokarzinom	3
12	A12	Colon	Adenokarzinom	2
13	B01	Colon	Karzinom	3
14	B02	Colon	Adenokarzinom	2
15	B03	Rektum	Adenokarzinom	2
16	B04	Colon	Adenokarzinom	3
17	B05	Colon	Adenokarzinom	2
18	B06	Rektum	Adenokarzinom	2
19	B07	Colon	Adenokarzinom	2
20	B08	Colon	Adenokarzinom	2
21	B09	Colon	Neuroendokrin	1
22	B10	Rektum	Adenokarzinom	X
23	B11	Colon	Adenokarzinom	2
24	B12	Colon	Adenokarzinom	X
25	C01	Colon	Adenokarzinom	2
26	C02	Colon	Adenokarzinom	2
27	C03	Colon	Neuroendokrin	1
28	C04	Rektum	Karzinom	3
29	C05	Colon	Neuroendokrin	1
30	C06	Colon	Adenokarzinom	3
31	C07	Colon	Neuroendokrin	1
32	C08	Colon	Adenokarzinom	2
33	C09	Colon	Adenokarzinom	2
34	C10	Colon	Adenokarzinom	2

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.
Fortsetzung auf Seite 16.

Tabelle 2, Fortsetzung: Zusammensetzung des Colon-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
35	C11	Colon	Adenokarzinom	2
36	C12	Colon	Neuroendokrin	3
37	D01	Colon	Adenokarzinom	2
38	D02	Colon	Adenokarzinom	2

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Galle/Pankreas-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Gallengang	Adenokarzinom	2
2	A02	Gallengang	Adenokarzinom	3
3	A03	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
4	A04	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	1
5	A05	Gallengang	Adenokarzinom	2
6	A06	Gallengang	Adenokarzinom	2
7	A07	Gallengang	Adenokarzinom	2
8	A08	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	X
9	A09	Gallenblase	Adenokarzinom	2
10	A10	Gallenblase	Karzinom	3
11	A11	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
12	A12	Gallengang	Adenokarzinom	2
13	B01	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
14	B02	Gallengang	Adenokarzinom	3
15	B03	Gallengang	Adenokarzinom	2
16	B04	Gallenblase	Adenokarzinom	2
17	B05	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
18	B06	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
19	B07	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	3
20	B08	Gallengang	Adenokarzinom	2
21	B09	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	X
22	B10	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
23	B11	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
24	B12	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	3
25	C01	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
26	C02	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	3
27	C03	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
28	C04	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
29	C05	Gallengang	Adenokarzinom	2
30	C06	Gallengang	Adenokarzinom	3
31	C07	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
32	C08	Gallengang	Adenokarzinom	2
33	C09	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	3
34	C10	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	2
35	C11	Gallengang/Pankreas	Adenokarzinom	3

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Lungen-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Lunge	Adenokarzinom	2
2	A02	Lunge	Adenokarzinom	3
3	A03	Lunge	Kleinzellig	3
4	A04	Lunge	Kleinzellig	3
5	A05	Lunge	Neuroendokrin	1
6	A06	Lunge	Kleinzellig	3
7	A07	Lunge	Kleinzellig	X
8	A08	Lunge	Plattenepithel	X
9	A09	Lunge	Kleinzellig	X
10	A10	Lunge	Kleinzellig	3
11	A11	Lunge	Neuroendokrin	3
12	A12	Lunge	Kleinzellig	1
13	B01	Lunge	Nicht-kleinzellig	X
14	B02	Lunge	Kleinzellig	X
15	B03	Lunge	Adenokarzinom	3
16	B04	Lunge	Kleinzellig	X
17	B05	Lunge	Adenokarzinom	2
18	B06	Lunge	Kleinzellig	X
19	B07	Lunge	Adenokarzinom	2
20	B08	Lunge	Karzinom	3
21	B09	Lunge	Kleinzellig	X
22	B10	Lunge	Karzinom	X
23	B11	Lunge	Neuroendokrin, großzellig	1
24	B12	Lunge	Kleinzellig	X

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mamma-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Mamma	Karzinom	3
2	A02	Mamma	Adenokarzinom	X
3	A03	Mamma	Adenokarzinom	2
4	A04	Mamma	Karzinom	X
5	A05	Mamma	Adenokarzinom, duktal	2
6	A06	Mamma	Adenokarzinom	2
7	A07	Mamma	Adenokarzinom, duktal	2
8	A08	Mamma	Adenokarzinom	3
9	A09	Mamma	Adenokarzinom	2
10	A10	Mamma	Adenokarzinom, alveolär	X
11	A11	Mamma	Adenokarzinom	X
12	A12	Mamma	Karzinom	X
13	B01	Mamma	Karzinom	X
14	B02	Mamma	Karzinom	3
15	B03	Mamma	Pleomorph	4
16	B04	Mamma	Adenokarzinom	X
17	B05	Mamma	Adenokarzinom	3
18	B06	Mamma	Adenokarzinom	2
19	B07	Mamma	Adenokarzinom	X
20	B08	Mamma	Adenokarzinom	X
21	B09	Mamma	Adenokarzinom	3
22	B10	Mamma	Karzinom, duktal	3
23	B11	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X
24	B12	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X
25	C01	Mamma	Karzinom	X
26	C02	Mamma	Karzinom, duktal	X
27	C03	Mamma	Karzinom, duktal	3
28	C04	Mamma	Karzinom	3
29	C05	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X
30	C06	Mamma	Karzinom	X
31	C07	Mamma	Adenokarzinom	3
32	C08	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X
33	C09	Mamma	Karzinom	X
34	C10	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht, G4: nicht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt. Fortsetzung auf Seite 20.

Tabelle 5, Fortsetzung: Zusammensetzung des Mamma-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
35	C11	Mamma	Karzinom, solid-alveolär	X
36	C12	Mamma	Adenokarzinom, duktal	X
37	D01	Mamma	Adenokarzinom	3
38	D02	Mamma	Adenokarzinom	X

Tabelle 6: Zusammensetzung des Haut-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Haut	Malignes Melanom, amelanotisch	X
2	A02	Aderhaut	Malignes Melanom	X
3	A03	Haut	Malignes Melanom, spindelzellig	X
4	A04	Aderhaut	Malignes Melanom, pigmentiert	X
5	A05	Haut	Malignes Melanom	X
6	A06	Aderhaut	Malignes Melanom	X
7	A07	Haut	Malignes Melanom, amelanotisch	X
8	A08	Aderhaut	Malignes Melanom	X
9	A09	Aderhaut	Malignes Melanom	X
10	A10	Aderhaut	Malignes Melanom	X

Tabelle 7: Zusammensetzung des Nieren-Array

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Niere	Klarzellig	2
2	A02	Niere	Klarzellig	X
3	A03	Niere	Klarzellig	1
4	A04	Niere	Klarzellig	2

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Pankreas-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Pankreas	Pleomorph	X
2	A02	Pankreas	Adenokarzinom	3
3	A03	Pankreas	Neuroendokrin	2
4	A04	Pankreas	Anaplastisch	3
5	A05	Pankreas	Adenokarzinom	3
6	A06	Pankreas	Adenokarzinom	2
7	A07	Pankreas	Adenokarzinom	2
8	A08	Pankreas	Adenokarzinom	2
9	A09	Pankreas	Adenokarzinom	2
10	A10	Pankreas	Adenokarzinom	2
11	A11	Pankreas	Adenokarzinom	2
12	A12	Pankreas	Adenokarzinom	3
13	B01	Pankreas	Adenokarzinom	3
14	B02	Pankreas	Karzinom	3
15	B03	Pankreas	Adenokarzinom, duktal	X
16	B04	Pankreas	Adenokarzinom	3
17	B05	Pankreas	Adenokarzinom	2
18	B06	Pankreas	Adenokarzinom	2

Tabelle 9: Zusammensetzung des Prostata-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Prostata	Karzinom	X
2	A02	Prostata	Adenokarzinom	3
3	A03	Prostata	Adenokarzinom	X

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Urothel-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Harnblase	Urothelkarzinom	X
2	A02	Urothel	Urothelkarzinom	3
3	A03	Urothel	Urothelkarzinom	3
4	A04	Urothel	Urothelkarzinom	3
5	A05	Harnblase	Karzinom	3
6	A06	Urothel	Karzinom	X
7	A07	Harnblase	Urothelkarzinom	X
8	A08	Urothel	Urothelkarzinom	3
9	A09	Urothel	Urothelkarzinom	X
10	A10	Nierenbecken	Urothelkarzinom	X
11	A11	Urothel	Urothelkarzinom	1

Tabelle 11: Zusammensetzung des Varia-Arrays

Nummer	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Ileum	Neuroendokrin	X
2	A02	Ovarien	Embryonal	3
3	A03	Duodenum	Neuroendokrin	2
4	A04	Magen	Adenokarzinom	2
5	A05	Anus	Kleinzellig, basaloid	X
6	A06	Ösophagus	Plattenepithel	X
7	A07	Ovarien	Adenokarzinom	2
8	A08	Parotis	Mukoepidermoidkarzinom	3
9	A09	Magen	Adenokarzinom	3
10	A10	Jejunum	Adenokarzinom	3
11	A11	Dünndarm	Neuroendokrin	1
12	A12	Schilddrüse	Neuroendokrin	X
13	B01	Urogenitaltrakt	Karzinom	3
14	B02	Magen	Neuroendokrin	3
15	B03	Dünndarm	Neuroendokrin	1
16	B04	Speichelgang/Parotis	Adenokarzinom, duktal	X
17	B05	Ösophagus	Karzinom	X
18	B06	Ovarien	Adenokarzinom	2
19	B07	Dünndarm	Neuroendokrin	1

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Primärtumor unbekannt-Arrays

Nr	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
1	A01	Unbekannt	Adenokarzinom	2
2	A02	Unbekannt	Adenokarzinom	X
3	A03	Magen/Darm	Adenokarzinom	2
4	A04	Unbekannt	Adenokarzinom	3
5	A05	Unbekannt	Adenokarzinom	2
6	A06	Unbekannt	Karzinom	3
7	A07	Unbekannt	Kleinzellig	X
8	A08	Unbekannt	Adenokarzinom	2
9	A09	Magen/Darm/Pankreas	Adenokarzinom	X
10	A10	Unbekannt	Adenokarzinom	2
11	A11	Unbekannt	Adenokarzinom	3
12	A12	Gastrointestinal/Lunge	Adenokarzinom	2
13	B01	Gastrointestinal/Lunge	Adenokarzinom	2
14	B02	Unbekannt	Neuroendokrin	X
15	B03	Unbekannt	Neuroendokrin	X
16	B04	Unbekannt	Adenokarzinom	2
17	B05	Unbekannt	Neuroendokrin	3
18	B06	Gastrointestinal/Gallengang	Adenokarzinom	3
19	B07	Unbekannt	Maligner Tumor	3
20	B08	Gastrointestinal	Adenokarzinom	2
21	B09	Magen/Pankreas	Adenokarzinom	X
22	B10	Unbekannt	Adenokarzinom	X
23	B11	Unbekannt	Plattenepithel, basaloid	3
24	B12	Unbekannt	Karzinom	X
25	C01	Unbekannt	Karzinoid/Paragangliom	X
26	C02	Gastrointestinal	Adenokarzinom	2
27	C03	Unbekannt	Neuroendokrin	1
28	C04	Unbekannt	Adenokarzinom	3
29	C05	Unbekannt	Kleinzellig	X
30	C06	Unbekannt	Leiomyosarkom	2
31	C07	Gastrointestinal	Neuroendokrin	X
32	C08	Gastrointestinal	Stromatumor	X
33	C09	Magen/Colon/Rektum	Adenokarzinom	3

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.
Fortsetzung auf Seite 24.

Tabelle 12, Fortsetzung: Zusammensetzung des Primärtumor unbekannt-Arrays

Nr	Koordinate	Primärtumor	Histologischer Typ	Grading
34	C10	Unbekannt	Plattenepithel, verhornt	2
35	C11	Unbekannt	Adenokarzinom	3
36	C12	Unbekannt	Kleinzellig	X
37	D01	Unbekannt	Karzinom	3
38	D02	Unbekannt	Neuroendokrin	3
39	D03	Unbekannt	Mesotheliom	X
40	D04	Gastrointestinal	Stromasarkom	X
41	D05	Unbekannt	Mesotheliom	X
42	D06	Gastrointestinal	Neuroendokrin	X
43	D07	Gastrointestinal	Neuroendokrin	X
44	D08	Unbekannt	Adenokarzinom	2
45	D09	Unbekannt	Plattenepithel	3
46	D10	Unbekannt	Adenokarzinom	3
47	D11	Unbekannt	Neuroendokrin	2
48	D12	Unbekannt	Adenokarzinom	3
49	E01	Hepatozellulär/Nebenniere	Karzinom	3
50	E02	Gastrointestinal/Prostata	Neuroendokrin	3

Abkürzungen Grading: G1: gut, G2: mäßig, G3: schlecht differenziert. GX: Differenzierung unbekannt.

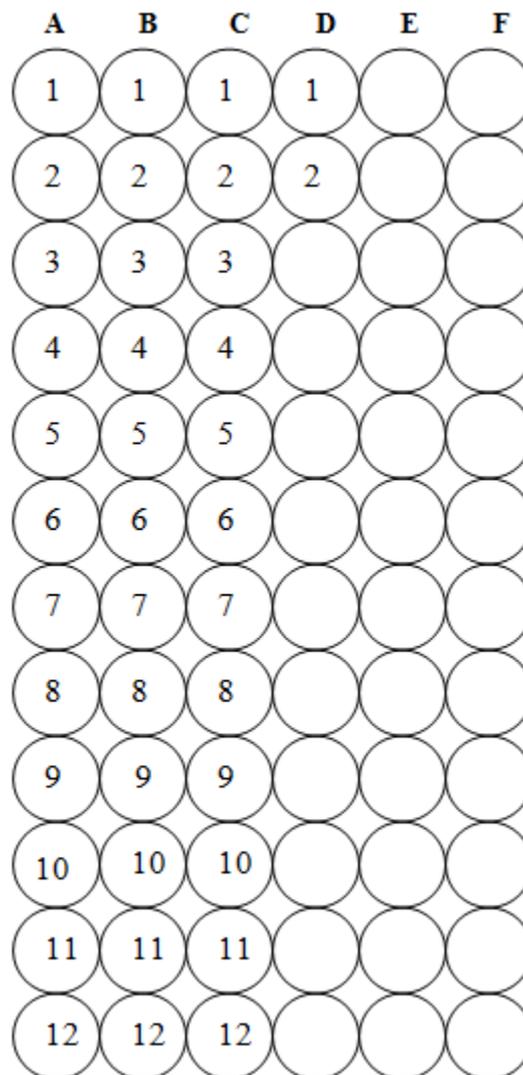


Abbildung 1: Koordinatenübersicht des Colon-Arrays

3.4 Herstellung der Tissue Microarrays

Das Tissue Microarray-Verfahren ermöglicht das Einbringen von bis zu tausend Gewebezylindern von histologisch definierten Arealen verschiedener Tumorgewebe in einen einzigen Paraffinblock (Kononen et al., 1998; Bubendorf et al., 2001; Sauter et al., 2003) (Abbildung 2). Da von jedem TMA-Block ungefähr 200 Schnitte (Dicke 4-8 μm) angefertigt werden können, wird so eine ausreichende Anzahl für spätere molekulare Untersuchungen gewährleistet (Kononen et al., 1998). Während sich die TMA-Technik in verschiedenen Studien unter Verwendung größerer Gewebepräparate schon lange bewährt hat (Dahl et al., 2007; Ruiz et al 2006; Zaharieva et al., 2003; Bolli et al., 2002), wurde im Rahmen der Dissertation von J. Niehaus (unveröffentlicht) ein Verfahren entwickelt, diese auch aus Stanzbiopsie-Material herzustellen.

Vor dem Stanzbeginn mussten als Erstes die benötigten elf Empfängerblöcke je nach Anzahl der vorgesehenen Gewebeproben vorgebohrt werden. Dies geschah am Gewebearray-Stanzgerät unter Verwendung eines 0,6 mm dicken Bohrers (Abbildung 3). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" des Geräts sorgte hierbei für eine konstante Länge der vorgebohrten Löcher. Um die horizontal liegenden markierten Tumorareale der einzelnen Stanzbiopsien aus ihren ursprünglichen Paraffinblöcken zu befreien, wurden diese erst kurz in einem warmen Wasserbad (Heizplatte Stufe 2) erwärmt und anschließend mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Mit einer Pinzette wurde das Gewebe erneut einige Sekunden in das warme Wasserbad gehalten, um die restliche Paraffinschicht zu entfernen. Danach wurde das übriggebliebene reine Gewebestanzmaterial mit einer Kanüle von 0,6 mm Durchmesser aufgezogen und senkrecht in die vorgebohrten Löcher des Empfängerblockes eingebracht. Bei Biopsiematerial, das eine kürzere Länge als die der vorgebohrten Löcher des Empfängerblockes aufwies, wurde die Differenz durch Paraffinfüllstücke ausgeglichen, welche in die unterste Schicht der Löcher im Empfängerblock eingebracht wurden. Dies geschah ebenfalls mit einer Kanüle von 0,6 mm Durchmesser. Zum Schluss wurden die fertigen elf Lebermetastasen-Arrays in einem Ofen (zehn Minuten bei 40°C) eingeschmolzen, um einen sicheren Halt der Gewebesots für die Weiterverarbeitung zu gewährleisten.

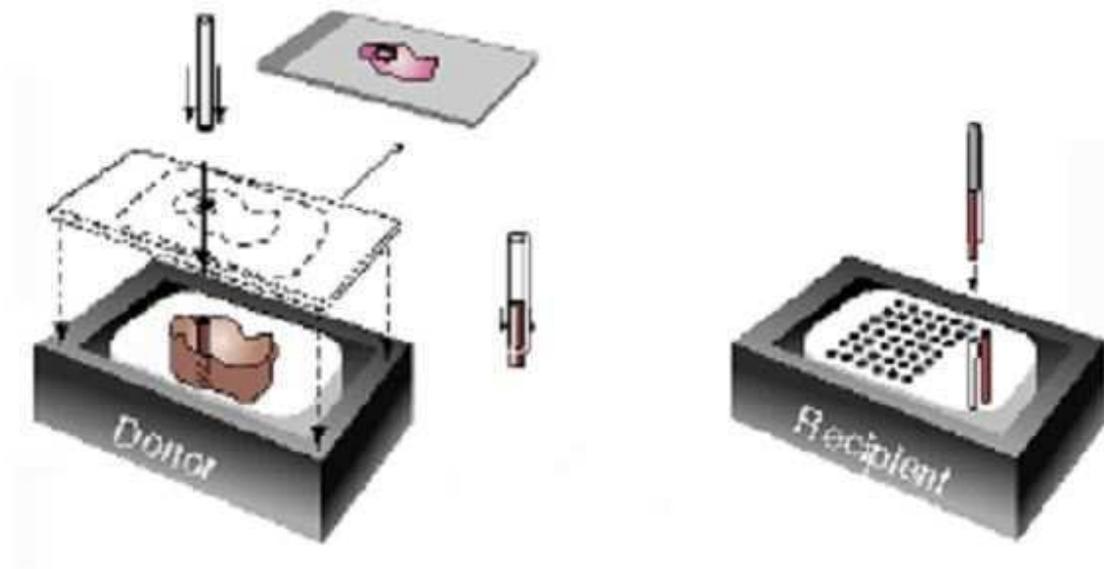


Abbildung 2: Prinzip der Tumorarray-Herstellung.

Die horizontal liegenden Gewebestanzbiopsien werden manuell mit einem Skalpell aus dem ursprünglichen Paraffinblock herausgeschnitten und danach mit Hilfe einer Kanüle senkrecht in den neuen Empfängerblock eingebracht.

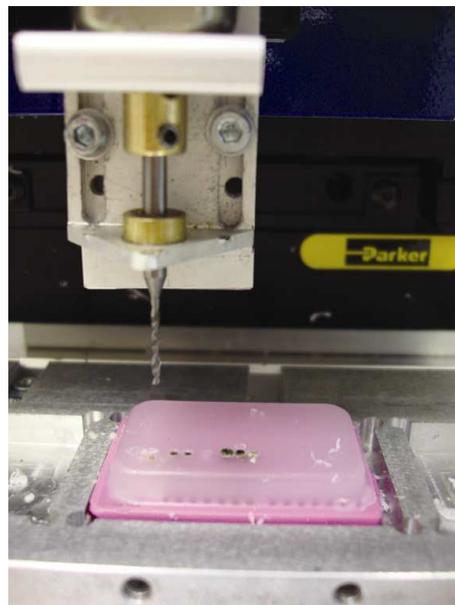


Abbildung 3: Gewebearray-Stanzgerät, Detailaufnahme Bohrer.

Mit dem Gewebearray-Stanzgerät werden die leeren Empfängerblöcke unter Verwendung eines 0,6 mm dicken Bohrers je nach benötigter Anzahl der vorgesehenen Gewebeproben vorgebohrt. Ein verstellbarer „Eindringstopper“ sorgt dabei für eine konstante Länge der vorgebohrten Löcher.

3.5 Immunhistochemie (IHC)

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von jedem TMA-Block drei µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden über Nacht in Xylol (SDS) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 2x 96%, 2x 80%) rehydriert.

Für die HER2-Untersuchung wurde der „HER2 Hercep-Test™“ mit dem „Autostainer Kit-System“ der Firma Dako Cytomation (Code: K5207) verwendet. Optimale Färbbedingungen wurden durch eine Mikrowellenvorbehandlung (1000 Watt, 20 Minuten) mit einem Demaskierungspuffer (0,1 mol Citrat) erreicht.

Im Autostainer (Dako Cytomation) durchliefen die TMA-Schnitte folgende Schritte:

1. Wasserstoffperoxid (3%), 5 Minuten, um die endogene Peroxidase zu blockieren.
2. Zugabe des Kaninchen-Antikörpers gegen das humane HER2-Protein, 30 Minuten.
3. Spülen im Tris Puffer (10fach konzentriert, Verdünnung 1:10, PH 6,7), 5 Minuten.
4. Zugabe des Visualisierungsreagenz, Meerrettichperoxidase mit Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin (konjugiert, gebrauchsfertig), 30 Minuten.
5. Behandlung mit Chromogen Diaminobenzidin (DAB 5%), 10 Minuten.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mit destilliertem Wasser gespült.

Als Positivkontrolle wurden die Mammakarzinom-Zelllinien MD 175 (1+) und SK BR3 (3+) verwendet, MD 231 (0) diente zur Negativkontrolle. Die Gegenfärbung erfolgte außerhalb des Autostainers in Haemalaun (nach Meyer), 15 Sekunden. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in aufsteigenden Alkohollösungen (2x 80%, 2x 96%, 2x 100%) und Xylol dehydriert und mit Eukitt (Kindler) eingedeckt.

Für die KIT-Untersuchung wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper CD117 der Firma Dako Cytomation (Code: A4502) verwendet. Dieser wurde 1:400 verdünnt. Ein optimales Färbeergebnis wurde durch eine Mikrowellenvorbehandlung (1000 Watt, 20

Minuten) bei einem PH-Wert von 7,8 erreicht. Die restlichen Schritte verliefen wie oben beschrieben. Für CD117 wurden weder Positiv- noch Negativkontrollen verwendet, da Mastzellen als interne Positivkontrolle in jedem Gewebe vorkommen.

Bei der immunhistochemischen Auswertung der einzelnen Lebermetastasen-Arrays wurden nur membranöse Färbungen berücksichtigt. Für jeden Tumorspot wurde zuerst die Zahl der positiven Zellen sowie auch die Intensität der Färbung beurteilt und semiquantitativ nach einem Score von 0 - 3+ eingeschätzt.

Die HER2-Untersuchungsergebnisse wurden nach dem Hercep-Score ausgewertet. Hierbei galt eine Färbeintensität zwischen 0 bis 1+ als negativ, während die Intensitäten 2+ und 3+ als immunhistochemisch positiv eingestuft wurden.

Für die KIT-Untersuchung erfolgte eine andere Kategorisierung:

- Negativ: Keine Färbung der Zellen nachweisbar.
- Schwach positiv: Färbeintensität von 1+ in weniger als 20% der Tumorzellen.
- Mäßig positiv: Färbeintensität von 1+ in mehr als 20% der Tumorzellen oder 2+ in weniger als 20% der Tumorzellen.
- Stark Positiv: Färbeintensität von 2+ in mehr als 20% der Tumorzellen oder der Nachweis einer Färbeintensität von 3+.

3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Für die nachstehend beschriebenen FISH-Untersuchungen wurden für EGFR die Sonde „EGFR Spectrum Orange™ CEP7“ und für HER2 die Sonde „Path Vysion HER2-DNA Probe Kit“ der Firma Abbott verwendet.

Zunächst wurden die drei µm dicken TMA-Schnitte zweimal zehn Minuten in Xylol (J.T.Baker) und zweimal fünf Minuten in Ethanol (96%) entparaffiniert und im Anschluss auf der Heizplatte (Störck-Tronic/Präzitherm) drei Minuten bei 48 °C

luftgetrocknet. Danach wurden die Schnitte mit dem Paraffin Pretreatment Reagent VP 2000 (Abbott) 15 Minuten bei 80 °C im Wasserbad und mit einer Proteaselösung VP 2000 (Abbott) 150 Minuten bei 37°C vorbehandelt. Die Proteaselösung bestand aus 250 mg Protease 1 gelöst in Protease Puffer 0,01 N HCL.

Nach dem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und 96% für jeweils drei Minuten) mit nachfolgender Trocknung auf der Heizplatte, drei Minuten bei 48 °C. Daraufhin wurden jeweils zehn µl EGFR-Sonde und zehn µl HER2-Sonde auf die dafür vorgesehenen Gewebeschnitte pipettiert, mit Deckgläsern bedeckt und mit Fixorum (Marabu, Tamm/Germany) versiegelt. Nach dem Aufbringen der Sonden wurden die Schnitte für fünf Minuten bei 72°C im ThermoBrite™ (Abbott Molecular, Stat Spin, Wiesbaden-Delkenheim) denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert.

Nach Entfernen des Fixorums am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger jeweils zweimal bei 72°C für zwei Minuten in SSC/0,3%NP 40 (PH 7,2 – 7,4) gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit 1000 ng/ml 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Abbott) gegengefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt.

Zur Auswertung der FISH-Signale wurden von allen Gewebeslots der Lebermetastasen-Arrays jeweils 20 Zellen (entspricht vier Gesichtsfeldern á fünf Zellen) mikroskopisch beurteilt. Für jeden Gewebeslot wurde sowohl die Anzahl der HER2- und Centromer 17-Signale als auch die Anzahl der EGFR- und Centromer 7- Signale pro Tumorzellkern eingeschätzt. Für die nachfolgende Klassifizierung wurde dann jeweils die absolute Anzahl der Kopiezahl und auch die Ratio (Verhältnis HER2 : Centromer 17 oder EGFR : Centromer 7) ermittelt. Eine Amplifikation lag gemäß dem Vysis-Score dann vor, wenn die Ratio größer war als 2.0.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertbarkeit der Lebermetastasen-Arrays

Von den 250 Lebermetastasen der elf verschiedenen Arrays konnten 156 (62,4%) Gewebeslots erfolgreich mit mindestens einem Marker analysiert werden. Fehlende Ergebnisse wurden vor allem durch fehlende Gewebeproben (50-58 Slots je nach Analyse) oder Abwesenheit von Tumorzellen in Gewebeproben (28-44 Slots je nach Analyse) verursacht. In der FISH-Analyse konnte zudem aufgrund von Hybridisierungsproblemen in 42-63 Gewebeproben trotz vorhandener Tumorzellen kein auswertbares Signal erhalten werden. Eine Übersicht über die analysierbaren Gewebeproben ist in Tabelle 13 gegeben. Die Gründe für Nichtanalysierbarkeit sind in Tabelle 14 dargestellt. Abbildung 4 zeigt eine Übersichtsaufnahme des Lebermetastasen-Arrays mit Mamma als Primärtumor.

Tabelle 13: Auswertbare Gewebesamples der Lebermetastasen-TMAs

Array Nummer	Lokalisation Primarius	Fälle pro TMA (N)	HER2 IHC	HER2 FISH	EGFR FISH	CD117 IHC
1	Colon	38	29	12	19	29
2	Galle/Pankreas	35	19	15	17	19
3	Lunge	24	18	9	12	18
4	Mamma	38	22	20	19	22
5	Melanom	10	7	2	4	7
6	Niere	4	1	1	0	1
7	Pankreas	18	11	4	9	11
8	Prostata	3	0	0	0	0
9	Urothel	11	10	8	8	10
10	Varia	19	13	4	13	13
11	PT unbekannt	50	26	19	17	26

Tabelle 14: Gründe für die Nicht-Auswertbarkeit der Lebermetastasen-TMAs

Array Nummer	Lokalisation Primarius	Fälle pro TMA	HER2 IHC	HER2 FISH	EGFR FISH	CD117 IHC
			Kein Tumor/ Gewebe	Kein Tumor/ Gewebe/	Kein Tumor/ Gewebe/	Kein Tumor/ Gewebe
1	Colon	38	6/3	3/7/16	1/6/12	5/4
2	Galle/Pankreas	35	8/8	6/10/4	6/8/4	8/8
3	Lunge	24	4/2	4/2/9	4/2/4	4/2
4	Mamma	38	7/9	7/8/3	7/9/3	7/9
5	Melanom	10	0/3	0/3/5	0/3/2	1/2
6	Niere	4	2/1	0/1/2	0/4/0	2/1
7	Pankreas	18	4/3	4/3/6	3/4/2	4/3
8	Prostata	3	3/0	3/0/0	3/0/0	3/0
9	Urothel	11	0/1	0/1/2	0/1/2	0/1
10	Varia	19	4/2	4/2/9	0/1/4	4/2
11	PT unbekannt	50	6/18	4/20/7	4/20/9	5/19

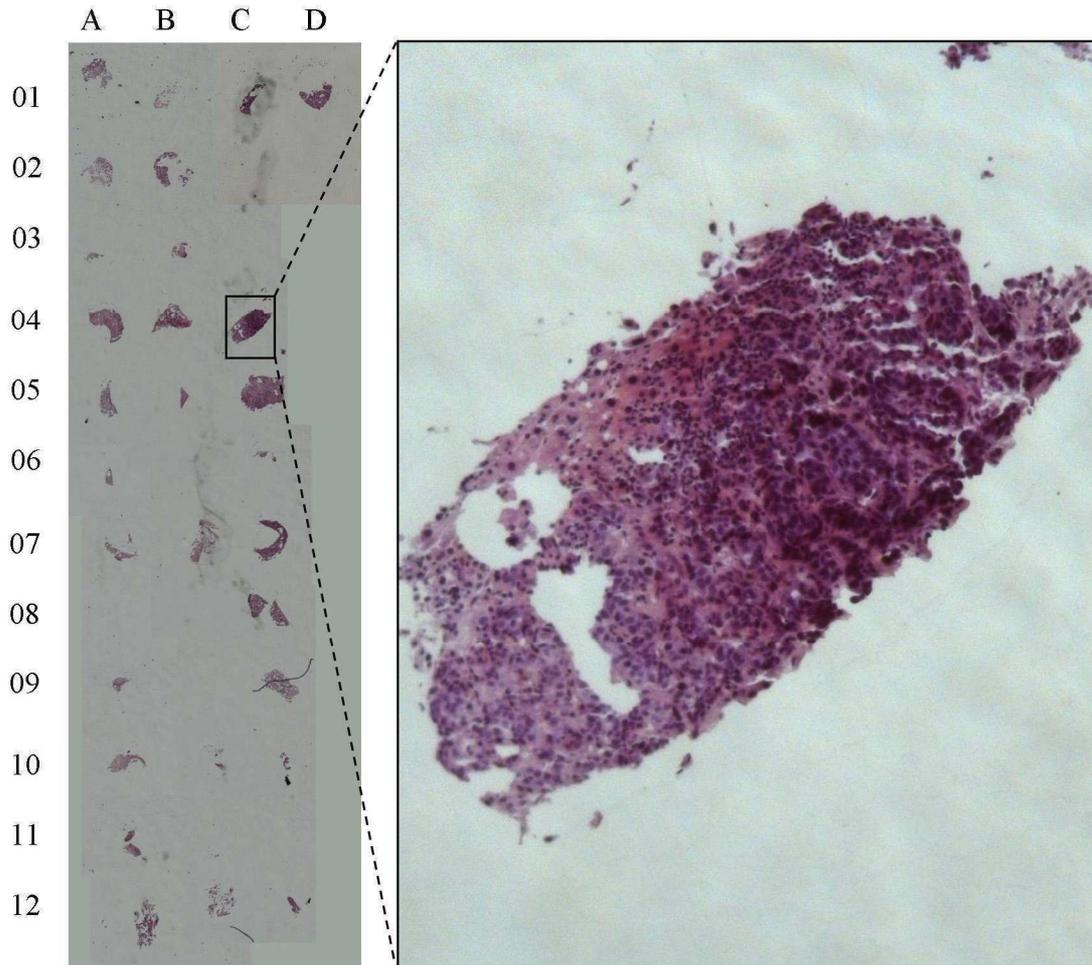


Abbildung 4: Übersicht des Mamma-Lebermetastasen-TMAs

Links: Übersicht des Mamma-Lebermetastasen-TMAs. HE-Färbung, fünffache Vergrößerung. Die Koordinaten A2, A4, A5, A11, A12, B2, B3, B4, B5, B7, B10, B12, C1, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C12, D1 zeigen auswertbares Tumorgewebe. An den Positionen A1, A3, A6, A7, A9, A10, B1 befinden sich Gewebespots, die keine Tumorzellen enthalten. An den Positionen A8, B6, B8, B9, B11, C2, C3, C11, D2 fehlen die Gewebeproben aufgrund zu geringen Biopsiematerials im Originalblock vollständig. Rechts: Zwanzigfache Vergrößerung eines Lebermetastasen-Spots (Koordinate C4) des Mamma-Arrays, HE-Schnitt.

4.2 HER2 Veränderungen in Lebermetastasen-Arrays

4.2.1 HER2 Expression

Eine HER2-Überexpression fand sich in sechs Lebermetastasen, darunter vier (4/22, 18,2%) Mammakarzinome (3+), ein (1/10, 10%) Urothelkarzinom (2+) und ein (1/26, 3,8%) Karzinom mit unbekanntem Primärtumor (3+). Das Urothelkarzinom wurde als herdförmiges nekrotisches solides Karzinom eingestuft. Bei dem Karzinom des Primärtumor unbekannt-Arrays handelt es sich um eine 76 jährige weibliche Patientin. Die HER2 FISH-Analyse (Verhältnis HER2-Gen/Centromer 17: 2/2, Ratio:0) zeigte sich in diesem Fall unauffällig. Auch ergab sich aus dem früheren Befund kein weiterer Anhaltspunkt für die Metastase eines Mammakarzinoms. Die Ergebnisse der HER2-Untersuchungen sind in Tabelle 15 aufgelistet. In der Abbildung 5 werden Lebermetastasen mit unterschiedlich starker HER2-Expression dargestellt.

Tabelle 15: HER2 Immunhistologie Resultate

Array Nummer	Lokalisation Primarius	Analysierbare Fälle (N)	negativ (%)	positiv (%)
1	Colon	29	100.0	0.0
2	Galle/Pankreas	19	100.0	0.0
3	Lunge	18	100.0	0.0
4	Mamma	22	81.8	18.2
5	Melanom	7	100.0	0.0
6	Niere	1	100.0	0.0
7	Pankreas	11	100.0	0.0
8	Prostata	0	-	-
9	Urothel	10	90.0	10.0
10	Varia	13	100.0	0.0
11	PT unbekannt	26	96.2	3.8

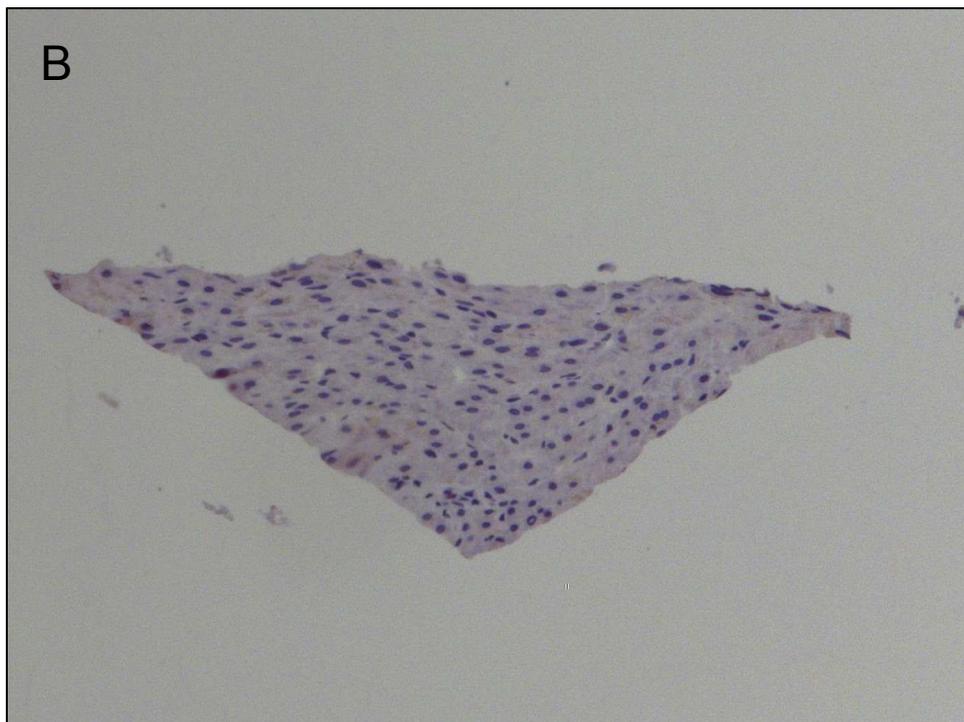
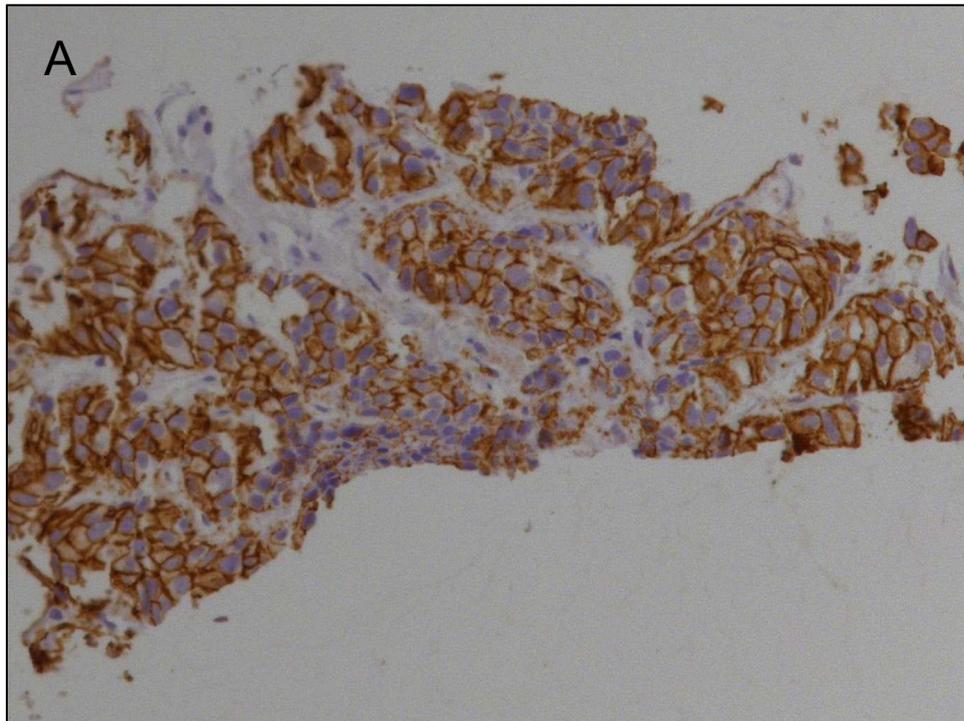


Abbildung 5: HER2-Immunhistochemie, zwanzigfache Vergrößerung.

Das Bild A zeigt eine stark positive (3+) Lebermetastase eines Mammakarzinoms, in Bild B wird eine HER2-negative Lebermetastase eines Mammakarzinoms dargestellt.

4.3 HER2 FISH-Signale

In der Tabelle 16 werden die HER2 FISH-Analysen der Lebermetastasen-Arrays dargestellt. HER2-Amplifikationen fanden sich in sieben Lebermetastasen. Darunter ein (1/15, 6,7%) mäßig differenziertes Adenokarzinom des Galle/Pankreas-Arrays mit der Verdachtsdiagnose eines Gallengangskarzinoms als Primärtumor. Hier zeigten die Tumorzellen fünf HER2-Gen und zwei Centromer 17 Signale (Ratio: 2,5). Die HER2-Amplifikation war in diesem Fall allerdings nur grenzwertig. Des Weiteren waren auch sechs (6/20, 30%) Mammakarzinome HER2-amplifiziert.

Tabelle 16: HER2 FISH-Analysen

Array Nummer	Lokalisation Primarius	Analysierbare Fälle (N)	amplifiziert (%)	normal (%)
1	Colon	12	0.0	100.0
2	Galle/Pankreas	15	6.7	93.3
3	Lunge	9	0.0	100.0
4	Mamma	20	30.0	70.0
5	Melanom	2	0.0	100.0
6	Niere	1	0.0	100.0
7	Pankreas	4	0.0	100.0
8	Prostata	0	-	-
9	Urothel	8	0.0	100.0
10	Varia	4	0.0	100.0
11	PT unbekannt	19	0.0	100.0

4.3.1 HER2 Expression und Amplifikation im Vergleich

Die FISH-Untersuchung ergab eine gute Übereinstimmung mit den Auswertungen der Immunhistochemie. Alle 3+ positiven Mammakarzinome (4/22, 18,2%) waren HER2 amplifiziert. Auch ein 1+ positiver Mammatumor (1/22, 4,5%) zeigte eine Amplifikation. Bei der sechsten Amplifikation des Mamma-Arrays konnte jedoch leider aufgrund von fehlendem Gewebe im HER2-Immunhistologiespot (Position A8) kein Vergleich gezogen werden. Der Zusammenhang zwischen den Resultaten der Immunhistologie und den Amplifikationen der FISH-Analyse ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: HER2 Expression und Amplifikation im Vergleich

HER2 IHC Graduierung	HER2 IHC Fälle	FISH amplifiziert (%)
0	142	0.7
1+	8	12.5
2+	1	0.0
3+	5	80.0

4.4 KIT (CD117) Expression in Lebermetastasen-Arrays

Insgesamt konnten drei Tumore (3/156, 1,9%) mit KIT-Expressionen diagnostiziert werden. Bei dem einen Colonkarzinom (mäßig positiv, 1/29, 3,4%) handelt es sich um ein undifferenziertes (kloakogenes) Karzinom mit Verdacht auf Rektum als Primärtumor. Auch zwei Lebermetastasen des Lungen-Arrays (2/18, 11,2%) zeigten eine KIT-Expression. Darunter ein schlecht differenziertes Adenokarzinom (stark positiv, 1/18, 5,6%) und ein kleinzelliges undifferenziertes Lungenkarzinom (schwach positiv, 1/18, 5,6%). Eine Übersicht der KIT-Ergebnisse ist in Tabelle 18 aufgelistet. Abbildung 6 zeigt die verschiedenen Grade der KIT-Expression bei Lebermetastasen.

Tabelle 18: KIT (CD117) Expression

Array Nr.	Lokalisation Primarius	Analysierbare Fälle (N)	Negativ (%)	Schwach positiv(%)	Mäßig positiv(%)	Stark positiv(%)
1	Colon	29	96.6	0.0	3.4	0.0
2	Galle/Pankreas	19	100.0	0.0	0.0	0.0
3	Lunge	18	88.9	5.6	0.0	5.6
4	Mamma	22	100.0	0.0	0.0	0.0
5	Melanom	7	100.0	0.0	0.0	0.0
6	Niere	1	100.0	0.0	0.0	0.0
7	Pankreas	11	100.0	0.0	0.0	0.0
8	Prostata	0	-	-	-	-
9	Urothel	10	100.0	0.0	0.0	0.0
10	Varia	13	100.0	0.0	0.0	0.0
11	PT Unbekannt	26	100.0	0.0	0.0	0.0

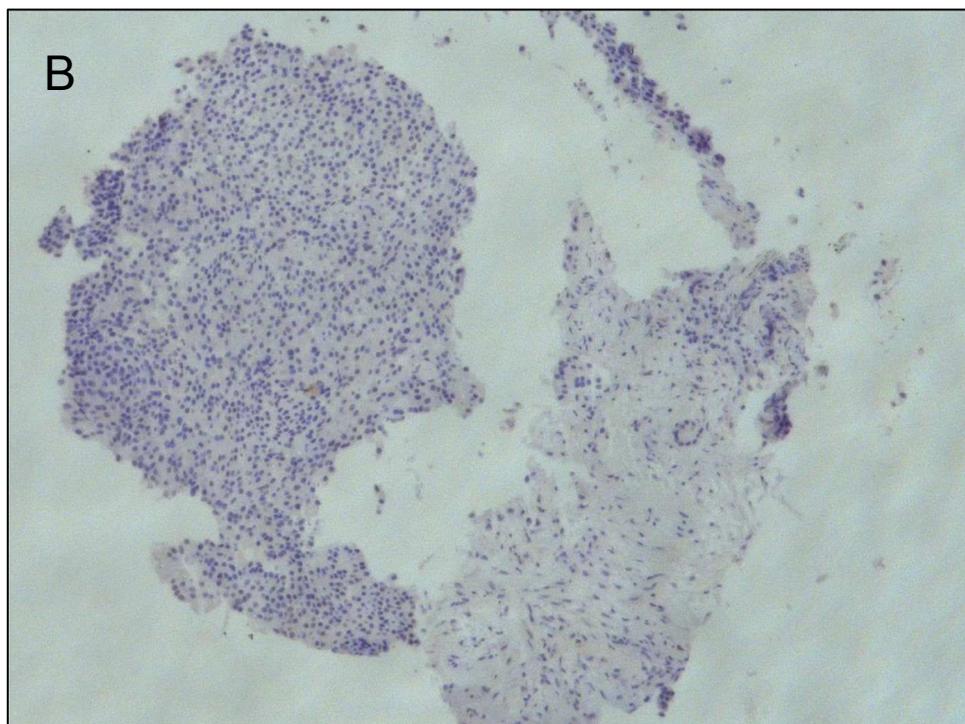
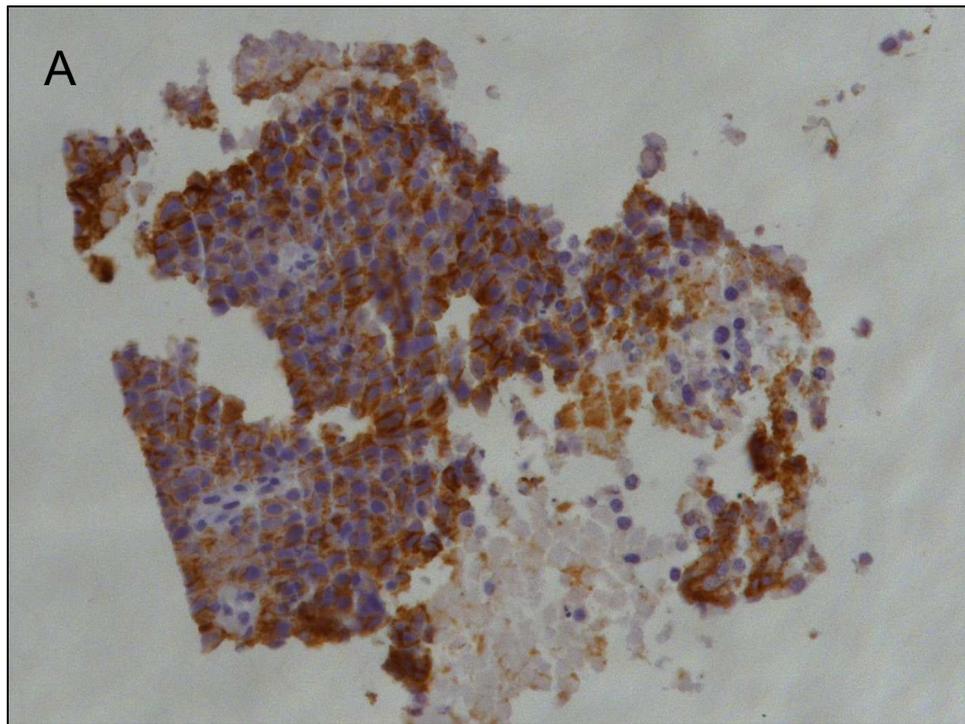


Abbildung 6: KIT- Immunhistochemie, zwanzigfache Vergrößerung.

Das Bild A zeigt eine stark positive (3+) Lebermetastase eines Lungenkarzinoms. In Bild B wird eine KIT-negative Lebermetastase eines Colonkarzinoms dargestellt.

4.5 EGFR FISH-Signale in Lebermetastasen-Arrays

Hier konnte nur eine (1/13, 7,7%) EGFR-Amplifikation im Varia-Array diagnostiziert werden. Diese betrifft ein schlecht differenziertes Mukoepidermoidkarzinom der Glandula Parotis. Die Tumorzellen zeigen hier je 10-15 EGFR-Gen und zwei Centromer 7 (Cen 7) Signale pro Zelle, was einer Ratio von 5-7,5 entspricht. Die kompletten Auswertungsergebnisse werden in Tabelle 19 gezeigt.

Tabelle 19: EGFR FISH-Signale

Array Nummer	Lokalisation Primarius	N	Ratio EGFR/Cen 7		EGFR Kopiezahl		
			amplifiziert	normal	1-2	3-4	>4
1	Colon	19	0	100	17	2	0
2	Galle/Pankreas	17	0	100	14	3	0
3	Lunge	12	0	100	12	0	0
4	Mamma	19	0	100	17	2	0
5	Melanom	4	0	100	4	0	0
6	Niere	0	-	-	-	-	-
7	Pankreas	9	0	100	8	1	0
8	Prostata	0	-	-	-	-	-
9	Urothel	8	0	100	7	1	0
10	Varia	13	7.7	92.3	11	1	1
11	PT unbekannt	17	0	100	16	1	0

5 Diskussion

Die Behandlung mit neuen genspezifischen Krebsmedikamenten, die beispielsweise gegen Tyrosinkinase Rezeptoren wie EGFR, HER2 oder KIT gerichtet sind, unterscheidet sich von den herkömmlichen Therapiemodalitäten dadurch, dass potentiell von der Therapie profitierende Patienten zuerst durch molekulare Zusatzuntersuchungen verifiziert werden müssen. In der Praxis werden diese Analysen, die oftmals erst viele Jahre nach der Entfernung des Primärtumors durchgeführt werden, retrospektiv vorgenommen. Da diese Zielgene in verschiedenen Tumoren exprimiert werden und zudem in den nächsten Jahren mit einer stetigen Zunahme neu auf dem Markt zugelassener Krebsmedikamente zu rechnen ist, stellt sich die Frage, wie sich der steigende Bedarf nach molekularer Zusatzdiagnostik auch in Zukunft bei einer großen Anzahl von Patienten logistisch in einer möglichst kurzen Zeitspanne umsetzen lässt (Sauter et Mirlacher, 2002).

Die Tissue Microarray Technik stellt einen möglichen Lösungsweg der Problematik dar. So könnten Gewebeproben von Primärtumoren vieler Tumorpatienten in ein TMA-Format gebracht werden und gegebenenfalls simultan innerhalb kurzer Zeit auf neu zugelassene Krebsmedikamente untersucht werden (Sauter et Mirlacher, 2002). Wünschenswert wäre es auch, dieses Verfahren direkt an entnommenen Biopsien von Metastasen anwenden zu können. Ziel dieser Arbeit war es deswegen, das innerhalb einer parallel durchgeführten Dissertation (Niehaus, unveröffentlicht) entwickelte Verfahren zur Erstellung von Tissue Microarrays aus Stanzbiopsien anhand von Lebermetastasen verschiedener Tumorentitäten zu evaluieren und als diagnostische Screeningmethode zu testen.

Im Rahmen unserer Arbeit konnten 156 (62,4%) von 250 Lebermetastasen erfolgreich mit mindestens einem Marker analysiert werden und mindestens acht (3,2%) therapierelevante molekulare Diagnosen gestellt werden. Eine EGFR-Amplifikation fand sich in einer Lebermetastase eines Mukoepidermoidkarzinoms. Des Weiteren konnte eine HER2-Amplifikation in einer Metastase eines Gallengangkarzinoms sowie in sechs Lebermetastasen des Mamma-Gewebearrays diagnostiziert werden. Vier der

sechs Mamma-Metastasen waren zudem stark (3+) HER2-positiv. Eine mäßige (2+) HER2-Expression zeigte sich in einer Lebermetastase eines Urothelkarzinoms sowie einer Lebermetastase eines unbekanntes Primärtumors. Die Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung waren hier jedoch unauffällig. Anhand der immunhistochemischen KIT-Untersuchung konnten außerdem eine stark positive (3+) Lebermetastase eines Lungenkarzinoms sowie eine mäßig positive (2+) Colonkarzinom-Metastase identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zwar die prinzipielle Machbarkeit einer routinemäßigen Untersuchung prädiktiver Marker an Lebermetastasen-Stanzbiopsien, dennoch liegt die Erfolgsrate der molekularen Untersuchungen der einzelnen Tissue Microarrays mit 62,4% bei der Immunhistochemie und 37,6% - 47,2% bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung weit unter dem Durchschnitt der sonst bei TMA-Studien üblichen Erfolgsquoten. Diese betragen nämlich im Durchschnitt für immunhistochemische Analysen 80-90% und für FISH-Auswertungen 70-80% (Al-Kuraya et al., 2004; Al-Kuraya et al., 2005; Ruiz et al., 2006).

Größter Schwachpunkt der durchgeführten Untersuchungen war die nicht hundertprozentige Erfolgsrate bei der TMA-Herstellung. Ein Hauptproblem hierfür war die Tatsache, dass in vielen Stanzbiopsie-Gewebeblöcken, die für die Herstellung der Tissue Microarrays verwendet wurden, bereits im Vorfeld - aufgrund schon erfolgter Untersuchungen - nur noch sehr spärliches Gewebematerial enthalten war. Dies zeigte sich deutlich bei der späteren Auswertung der hergestellten Schnitte, wo bei 20-23,2% der Patienten keine Gewebespot auf den Objektträgern vorhanden waren (IHC-HER2: 20%, IHC-CD117: 20,4%, FISH-HER2: 22,8%, FISH-EGFR: 23,2%). Eine weitere Schwierigkeit stellte die Treffsicherheit von Tumorgewebe bei der TMA-Herstellung dar. Dies war besonders dann problematisch, wenn die Stanzbiopsien mehrere kleine Tumoreale, aber auch normales Lebergewebe enthielten. Bei der späteren Beurteilung der Schnitte zeigte sich dies dadurch, dass bei 11,2-17,6% der Gewebespot normales Lebergewebe vorhanden war (IHC-HER2: 17,6%, IHC-CD117: 17,6%, FISH-HER2: 14,0%, FISH-EGFR: 11,2%). Zuletzt ergaben sich aber auch aus technischen Gründen Auswertungsprobleme. So konnten weitere 25,2% der Gewebespot bei der HER2- und

16,8% bei der EGFR-FISH-Analyse wegen Hybridisierungsstörungen nicht ausgewertet werden. Dieses Problem war in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht größer als bei vergleichbaren TMA-Studien (Al-Kuraya et al., 2004; Al-Kuraya et al., 2005; Ruiz et al., 2006). Zusammengefasst zeigen diese Schwierigkeiten, wie sehr die Auswertbarkeit der Gewebeproben von der Qualität der hergestellten Tissue Microarrays abhängt.

Da die Stanzerfolgsquote der einzelnen Lebermetastasenbiopsien in unserer Studie zu gering ist, um das Verfahren unverändert für weitere diagnostische Zwecke einsetzen zu können, stellt sich nun die Frage, durch welche Maßnahmen man die Qualität der TMA-Herstellung verbessern könnte.

Ein Ansatz für die Verbesserung der Stanzqualität wäre das ausschließliche Verwenden von neuen Stanzbiopsien, bei denen noch kein Material durch bereits im Vorfeld erfolgte Diagnostik verbraucht wurde. Dies könnte nicht nur die Trefferquote der Stanztechnik deutlich verbessern, sondern auch die Erfolgsrate nachfolgender molekularer Untersuchungen erhöhen. Außerdem könnte so gewährleistet werden, dass das gesamte Gewebe für nachfolgende Untersuchungen genutzt werden kann.

Zudem ist es möglicherweise für molekulare Analysen von Stanzbiopsien vorteilhaft, mehrere Gewebeproben aus dem Patienten zu entnehmen und in ein TMA-Format einzubringen. Im Rahmen einer früheren Untersuchung von 785 Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von drei bis vier Gewebestanzen pro Patient 99% der Karzinome in den nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen beurteilt werden konnten. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Verwendung von drei bis vier Stanzen bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Hier konnten immerhin 95% der Gewebeslots erfolgreich analysiert werden. Für die mangelnde Auswertbarkeit der fehlenden 5% war jedoch nicht die TMA-Technik verantwortlich, sondern inhärente Hybridisierungsstörungen der FISH-Analyse (Lipp, 2002). Gemäß den in unserer Studie erzielten Resultaten wären bei zwei Stanzen 85,86%, bei vier Stanzen 98% und bei sechs Stanzen 99,72% auswertbare Fälle zu erwarten. Dies würde zumindest für die Immunhistochemie zutreffen. Die Erfolgsrate unserer FISH-Analysen könnte theoretisch durch die Verwendung von zwei Stanzen auf

61,06-72,12%, von vier Stenzen auf 84,4 – 92,23% und von sechs Stenzen auf 94,1 – 97,83% gesteigert werden. Allerdings zeigt die oben genannte Studie, dass sich FISH-Hybridisierungsprobleme auch durch die Verwendung zusätzlicher Gewebeproben nicht vollständig vermeiden lassen.

Zweiter Schwerpunkt unserer Untersuchung war die Frage, ob das Verfahren in Kombination mit einer nachfolgenden Untersuchung auf die molekularen Marker EGFR, HER2 und KIT dafür geeignet ist, repräsentative Diagnosen anhand von Stanzbiopsien verschiedener Lebermetastasen stellen zu können.

Für HER2 entsprechen die Häufigkeiten der Aberrationen im Wesentlichen den aus der Literatur erwarteten Befunden. Eine HER2-Amplifikation wurde in dieser Studie bei 30% (6/20) der Mammakarzinome festgestellt. Dies entspricht der früheren Literatur, in der eine HER2-Amplifikation in 15-30% der Fälle beschrieben wird (Piccart-Gebhart et al., 2005; Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989). In unserer Studie zeigten alle stark positiven (3+) Mammakarzinome auch eine HER2-Amplifikation. Diese Übereinstimmung (100%) passt also gut zu verschiedenen Berichten, in denen eine hohe Konkordanz (> 90%) zwischen beiden Techniken aufgezeigt wurde (Jacobs et al., 1999; Zhang et al., 2003; Tapia et al., 2007). Neben den Mammakarzinomen wurde eine HER2-Amplifikation auch bei einer Lebermetastase eines Gallengangskarzinoms diagnostiziert. Während cholangiozelluläre Karzinome mit einer Inzidenz von 2-4/100000 pro Jahr in den westlichen Ländern eher selten vorkommen, gehören sie in vielen Ländern Asiens zu den häufigen Tumoren (Tischhoff et Tannapfel, 2007). Daher stammen die meisten Studien, die sich mit der Evaluation des HER2-Status in Gallengangskarzinomen beschäftigten, aus China (Zheng et Zhu, 2007), Japan (Yoshikawa et al, 2008) und Südkorea (Kim et al., 2007). Diese berichteten von einer HER2-Überexpression in 0-81,8% (Nakazawa et al., 2005; Yoshikawa et al, 2008; Shibahara et al., 2004; Ito et al., 2001; Terada et al., 1998; Ukita et al., 2002) der intrahepatischen und 5,1-80% (Nakazawa et al., 2005; Yoshikawa et al. 2008; Kim et al., 2007; Zheng et Zhu, 2007) der extrahepatischen cholangiozellulären Karzinome. Die relativ große Spannbreite der Ergebnisse kommt wahrscheinlich weniger durch unterschiedlich selektionierte Patientenkollektive als durch stark differente

Nachweismethoden zustande. Nur wenige Arbeiten untersuchten die Tumore auf eine mögliche HER2-Amplifikation. So konnten Ukita et al. (2002) mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) eine HER2-Amplifikation in allen 22 intrahepatischen Gallengangskarzinomen (100%) erkennen. Davon waren 82% auch HER2-überexprimiert. Kim et al. (2007) diagnostizierten mittels Chromogenic in situ Hybridisierung (CISH) in 18,1% von 55 extrahepatischen Cholangiokarzinomen eine HER2-Amplifikation. Auch hier waren alle immunhistochemisch stark positiven (3+) und 57% der mäßig positiven (2+) Fälle HER2-amplifiziert. Europäische Studien sind kaum vorhanden. Altamari et al. (2003) berichteten von einer HER2-Überexpression in 4% von 48 intrahepatischen Gallengangskarzinomen. Durch eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnte in diesen 4% auch eine HER2-Amplifikation nachgewiesen werden. Collier et al. (1992) untersuchten zehn cholangiozelluläre Karzinome europäisch-kaukasischer Herkunft, doch eine HER2-Expression ließ sich nicht feststellen.

In unserer Studie fanden sich des Weiteren eine HER2-Überexpression (2+) bei einem von zehn Urothelkarzinomen, sowie bei einer Lebermetastase mit unbekanntem Primärtumor. Die Inzidenz der HER2-Überexpression bei Urothelkarzinomen wurde zwischen 23-71 % beschrieben (Latif et al., 2004; De Pinieux et al., 2004; Gandour-Edwards et al., 2002; Krüger et al., 2002). Die Höhe der mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung untersuchten HER2-Amplifikationen lag in verschiedenen Studien zwischen 5%-43% (Krüger et al., 2002; Simon et al., 2003; Latif et al., 2003; Hauser-Kronberger et al., 2006). Während Krüger et al. (2002) in ihrer Arbeit über 138 muskelinvasive Harnblasenkarzinome keine signifikante Beziehung zwischen HER2-Expression, Tumorstadium sowie Lymphknotenstatus feststellen konnten, konnten Kolla et al. (2008) kürzlich in ihrer Studie über 90 muskelinvasive Harnblasenkarzinome das Gegenteil belegen. Hier korrelierte die HER2-Expression gravierend mit dem Tumorstadium (P:0,001), der Lymphknotenbeteiligung (positiver Lymphknoten-Status 77% gegenüber 23% ohne Lymphknotenbeteiligung) sowie dem Schweregrad des Tumorgeschehens (22% Grad 2 gegenüber 71% Grad 3). Beide Studien stellten jedoch fest, dass Patienten mit HER2-exprimierenden Tumoren eine deutlich

schlechtere Überlebensrate aufweisen als Patienten mit Her2-negativen Karzinomen (Kolla et al., 2008, Krüger et al., 2002).

Da die Aussagekraft immunhistochemisch positiver EGFR-Resultate bezüglich Prognose und Ansprechen auf Anti-EGFR-Medikamente derzeit immer noch unklar ist (Dei Tos, 2007; Toschi et Cappuzzo, 2007), verzichteten wir im Rahmen der Arbeit auf diese Untersuchung und nahmen anstatt dessen eine FISH-Analyse vor. Eine klassische high-level Amplifikation fand sich allerdings nur in einer Metastase eines Mukoepidermoidkarzinoms der Glandula Parotis. Über EGFR-Amplifikationen bei dieser Karzinomart wurde keine Literatur gefunden. Yamada et al. (1989) berichteten allerdings von einem immunhistochemisch positiven EGFR-Status in 33,8% der mukoepidermoiden Speicheldrüsenkarzinome. Gibbons et al. (2001) zeigten, dass diese sowohl eine starke Expression für den zytoplasmatischen als auch den membranösen EGFR aufweisen, wobei ein hoher Prozentsatz außerdem zeitgleich ErbB3-positiv war. Hoyek-Gebeily et al. (2007) stellten in einer retrospektiven Studie über Mukoepidermoidkarzinome der Speicheldrüsen (besonders Glandula Parotis) fest, dass die Höhe der EGFR-Expression stark mit dem histologischen Tumorgrad korrelierte und einen schlechten prognostischen Marker darstellte. Obwohl Cappuzzo et al. (2005) berichteten, dass Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und einer EGFR-Genamplifikation (12,7%) oder hoher Polysomie (19,6%) vermehrt auf eine Gefitinib-Therapie ansprechen und eine bessere Prognose aufwiesen, konnte in unserem Lungen-Gewebearray keine einzige EGFR-Amplifikation verifiziert werden. Alle zwölf analysierbaren Gewebesots waren unauffällig.

Im Rahmen unserer Arbeit konnte eine KIT (CD117)-Expression sowohl in einem Colonkarzinom (mäßig positiv 1/29, 3,4%), als auch in zwei Lungenkarzinomen (stark positiv: 1/18, 5,6%, schwach positiv: 1/18, 5,6%) diagnostiziert werden. Obwohl Preto et al. (2007) kürzlich in einer Studie bei 15% von 73 colorektalen Karzinomen (CRC), sowie 14% von 36 zugehörigen Lymphknotenmetastasen eine erhöhte KIT-Expression aufzeigen konnten, berichteten andere Autoren, dass dies eher seltener der Fall ist. Singer et al. (2004) konnten innerhalb ihrer Studie nur bei 6% der Patienten mit colorektalen Karzinomen eine KIT-Überexpression feststellen, während Reed et al.

(2002) sogar nur bei 1,6% der colorektalen Tumorpatienten eine starke CD117-Positivität beschrieben. Arbeiten, die verschiedene Lungentumore auf eine mögliche KIT-Expression evaluierten, berichteten von erhöhten Expressionsraten in 6-88% der kleinzelligen Karzinome (SCLC) (Went et al., 2004; Micke et al., 2003; López-Martin et al., 2007; Rohr et al. 2004), 17-64% der Adenokarzinome (Butnor et al., 2004; Went et al., 2004; Micke et al., 2004), 17-60% der großzelligen Karzinome (Went et al., 2004; Butnor et al., 2004; Rossi et al., 2003), 50-55% der großzelligen neuroendokrinen Karzinome (La Point et al., 2007; Araki et al., 2003) und 0-9% der squamösen Lungenkarzinome (Rossi et al., 2003; Butnor et al., 2004; Went et al., 2004). Unsere Befunde zeigten allerdings ausser bei einem Adenokarzinom (3+) und einem kleinzelligen Karzinom (1+) keine erhöhten Expressionsraten bei Lungentumoren. Zudem konnte in unserer Studie auch keine CD117-Überexpression bei malignen Melanomen nachgewiesen werden, die von Went et al. (2004) in 35% der Fälle beschrieben wird. Auch unser einziger Fall eines gastrointestinalen Stromatumors war KIT-negativ.

Die Ergebnisse dieser Arbeit hinterlassen ein gemischtes Bild. Die insgesamt relativ gute Übereinstimmung unserer Resultate mit den Daten der Literatur spricht dafür, dass an dem Metastasengewebe grundsätzlich repräsentative Befunde für den Zustand eines metastasierenden Tumors gewonnen werden können. Jedoch war die Stanzerfolgsquote der einzelnen Gewebeproben in unserer Untersuchung zu gering, um das Verfahren in dieser Form unverändert für diagnostische Zwecke einsetzen zu können. Weitere Maßnahmen sind jetzt notwendig, um eine qualitative Verbesserung der Stanztechnik mit einer genügend großen Anzahl von beurteilbaren Metastasen zu erreichen. Die Verwendung multipler Gewebeproben pro Patient könnten eine mögliche Lösung dieses Problems darstellen. Zudem könnte die Stanzqualität der Tissue Microarrays durch die ausschließliche Verwendung von neuen Stanzbiopsien, bei denen noch kein Material durch im Vorfeld erfolgter Untersuchungen verbraucht wurde, erheblich verbessert werden.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert, sämtliche Tumorbiopsien von Metastasen oder nicht-operablen Primärtumoren in ein Stanzzylinder-TMA-Format zu bringen, um die Gewebe der Patienten für die weitere Dauer ihres Tumorleidens regelmäßig auf aktuell werdende Therapieziele überprüfen zu können (Sauter et Mirlacher, 2002). Zudem könnten auf diese Weise auch Patienten, bei denen ein Zielgen zwar als positiv diagnostiziert wird, für das es aber noch keine zugelassene Tumorthherapie gibt, für klinische Studien ausgewählt werden. Die Reihenuntersuchung von Tumoren auf molekulare Zielgene in einem TMA-Format stellt eine interessante und ökonomische Lösung des Problems dar, dass in Zukunft eine große Anzahl von Patienten auf viele molekulare Marker untersucht werden muss, wobei jedoch für die einzelnen Therapiezielgene nur selten positive Befunde zu erwarten sind. Beispielsweise wurden im Rahmen einer früheren Studie über colorektale Karzinome nur in vier von 404 Tumoren (1,3%) klassische high-level HER2-Amplifikationen festgestellt (Al-Kuraya et al., 2007). Die routinemäßige Untersuchung von Colonkarzinomen mit einer teuren HER2-FISH-Probe wäre derzeit aber aufgrund der knappen Ressourcen des Gesundheitssystems nur schwierig umsetzbar. Die Durchführung einer derartigen Untersuchung in einem TMA-Format könnte die Kosten massiv reduzieren und es erlauben, Patienten mit seltenen, aber möglicherweise therapielevanten genetischen Konstellationen zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

Die großen Fortschritte der Genforschung haben zu einem besseren Verständnis der Entstehung maligner Tumorgeschehen geführt. Die Entdeckung spezifischer Signalkaskaden, die aufgrund einer unphysiologischen Aktivierung von Oberflächenrezeptoren für eine Zellentartung verantwortlich sind, ermöglicht die Entwicklung vieler neuer gezielter Therapiestrategien. So sind beispielsweise für die Oberflächenrezeptoren EGFR, HER2 und KIT bereits spezifische Medikamente für die Behandlung von Krebspatienten zugelassen und eine noch größere Anzahl befindet sich derzeit in vorklinischen und klinischen Studien. Um diese Medikamente allerdings optimal einsetzen zu können, ist die Durchführung einer molekularen Zusatzdiagnostik zur Erfassung geeigneter Patientengruppen notwendig. Da aber zumindest theoretisch jeder noch lebende Krebspatient von einer solchen Behandlung profitieren könnte, müssen neue Strategien gefunden werden, diese Untersuchungen auch bei einer sehr großen Anzahl von Patienten in relativ kurzer Zeit durchführen zu können.

Der Einsatz von Tissue Microarrays als diagnostisches Hilfsmittel stellt eine mögliche Lösung dieser Problematik dar. Mit der TMA-Technik können bis zu tausend verschiedene Gewebeproben auf einen einzigen Objektträger gebracht werden und anschließend simultan mit in situ Methoden untersucht werden. So wäre es innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne möglich, geeignete Patienten für neue Therapieziele auszuwählen. Erst kürzlich wurde im Rahmen einer Dissertation am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf ein neues Verfahren entwickelt, Tissue Microarrays auch aus Stanzbiopsien herzustellen. Hierbei werden die vorher horizontal eingebetteten Gewebestanzungen senkrecht in die vorgebohrten Löcher des Empfängerblockes eingefügt, wodurch die Möglichkeit entsteht, ausreichend Gewebeschnitte für nachfolgende molekulare Untersuchungen zu gewinnen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Praktikabilität der neuen Stanztechnik anhand von Lebermetastasen-Stanzbiopsien verschiedener Tumorentitäten zu evaluieren und Daten zur Frage zu erheben, ob die Methode zur Erfassung repräsentativer diagnostischer Befunde aus Lebermetastasen-Stanzbiopsien geeignet ist.

Zu diesem Zweck wurde ein Kollektiv von 250 Stanzbiopsien verschiedener Lebermetastasen zusammengestellt, die je nach Lokalisation des Primärtumors in elf Tissue Microarrays eingebracht wurden (Colon, Galle/Pankreas, Lunge, Mamma, Melanom, Niere, Pankreas, Prostata, Urothel, Varia und Primärtumor unbekannt). Im Anschluss wurden von jedem Tissue Microarray Schnitte angefertigt, welche mittels Immunhistochemie auf die molekularen Marker HER2 und KIT und mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf die molekularen Marker EGFR und HER2 untersucht wurden.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, wie sehr die Auswertbarkeit der Gewebeproben von der Qualität der Tissue Microarrays abhängt. So konnten bei den immunhistochemischen Untersuchungen jeweils nur 62,4% der 250 Gewebestanden ausgewertet werden. Auch bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung variierte die Zahl der auswertbaren Gewebestanden zwischen 37,6–47,2%. Wichtige qualitätslimitierende Faktoren der TMA-Herstellung waren zu geringes Stanzbiopsiematerial im Vorfeld, weswegen das Gewebe auf den später hergestellten Schnitten fehlte (22-23,2%), und eine zu geringe Treffsicherheit von Tumorgewebe bei Biopsien, die sowohl Tumorareale als auch normales Lebergewebe enthielten (11,2–17,6%). Zudem führten technische Probleme der FISH-Untersuchung bei weiteren 16,8–25,2% der Gewebesots zu keinem auswertbaren Resultat.

Dennoch konnten von den 250 Lebermetastasen 156 Gewebesots (62,4%) erfolgreich mit mindestens einem Marker ausgewertet und mindestens acht (3,2%) therapie-relevante molekulare Diagnosen gestellt werden: In der Lebermetastase eines Mukoepithelkarzinoms konnte eine EGFR-Amplifikation identifiziert werden. Außerdem zeigte sich sowohl in der Metastase eines Gallengangskarzinoms als auch in sechs Lebermetastasen des Mamma-Gewebearrays eine HER2-Amplifikation. Vier der sechs Mamma-Metastasen waren zusätzlich stark (3+) HER2 positiv. In den Lebermetastasen eines Urothelkarzinoms sowie in den Lebermetastasen eines unbekanntes Primarius fand sich eine mäßige HER2-Expression (2+). Im Rahmen der KIT-Untersuchung wurde zudem eine stark positive (3+) Lebermetastase eines Lungenkarzinoms und eine mäßig positive (2+) Colonkarzinom-Metastase

diagnostiziert. Dabei zeigte die insgesamt relativ gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den Daten der Literatur, dass es grundsätzlich möglich ist, repräsentative diagnostische Befunde aus Metastasen-Stanzbiopsien zu gewinnen.

Leider war die Erfolgsquote der TMA-Herstellung in dieser Studie noch zu gering, um die Technik unverändert als diagnostische Untersuchungsmethode nutzen zu können. Weitere Studien sind deshalb erforderlich, um eine qualitative Verbesserung der Stanztechnik sowie eine größtmögliche Anzahl von auswertbaren Stanzbiopsien zu erreichen. Die Verwendung mehrerer Gewebeproben pro Patient könnte eine mögliche Lösung dieses Problems darstellen. Zudem könnte die Stanzqualität der Tissue Microarrays theoretisch durch die ausschließliche Verwendung von neuen Stanzbiopsien, bei denen noch kein Material durch bereits im Vorfeld erfolgte Diagnostik verbraucht wurde, erheblich verbessert werden.

Für die Zukunft wäre es nach einer Optimierung der TMA-Technik wünschenswert, sämtliche Tumorbiopsien von Metastasen oder inoperablen Primärtumoren in ein Stanzzylinder-TMA-Format zu bringen, um die Gewebe der Patienten für die weitere Dauer ihres Tumorleidens regelmäßig auf aktuell werdende Therapieziele überprüfen zu können.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNGEN:

Abbildung 1: Koordinatenübersicht des Colon-Arrays	25
Abbildung 2: Prinzip der Tumorarray-Herstellung	27
Abbildung 3: Gewebearray-Stanzgerät, Detailaufnahme Bohrer	27
Abbildung 4: Übersicht des Mamma-Lebermetastasen-TMAs	33
Abbildung 5: HER2-Immunhistochemie, zwanzigfache Vergrößerung	35
Abbildung 6: KIT- Immunhistochemie, zwanzigfache Vergrößerung	39

TABELLEN:

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Lebermetastasen-Arrays	14
Tabelle 2: Zusammensetzung des Colon-Arrays	15
Tabelle 3: Zusammensetzung des Galle/Pankreas-Arrays	17
Tabelle 4: Zusammensetzung des Lungen-Arrays	17
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mamma-Arrays	19
Tabelle 6: Zusammensetzung des Haut-Arrays	20
Tabelle 7: Zusammensetzung des Nieren-Array	20
Tabelle 8: Zusammensetzung des Pankreas-Arrays	21
Tabelle 9: Zusammensetzung des Prostata-Arrays	21
Tabelle 10: Zusammensetzung des Urothel-Arrays	22
Tabelle 11: Zusammensetzung des Varia-Arrays	22
Tabelle 12: Zusammensetzung des Primärtumor unbekannt-Arrays	22
Tabelle 13: Auswertbare Gewebesamples der Lebermetastasen-TMAs	31
Tabelle 14: Gründe für die Nicht-Auswertbarkeit der Lebermetastasen-TMAs	32
Tabelle 15: HER2 Immunhistologie Resultate	34
Tabelle 16: HER2 FISH-Analysen	36
Tabelle 17: HER2 Expression und Amplifikation im Vergleich	37
Tabelle 18: KIT (CD117) Expression	38
Tabelle 19: EGFR FISH-Signale	40

8 Abkürzungsverzeichnis

CEN	Centromer
CD	Cluster of Differentiation
CISH	Chromogenic in situ Hybridisierung
CRC	Colorektales Karzinom
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERBB1	v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (avian)
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/ glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
G1	Grad 1, gut differenziertes bösartiges Gewebe (low-grade)
G2	Grad 2, mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
G3	Grad 3, schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe
G4	Grad 4, nicht differenziertes bösartiges Gewebe (high-grade)
GX	Grad der Gewebedifferenzierung unbekannt
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER1	Human epidermal growth factor receptor 1
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HER3	Human epidermal growth factor receptor 3
HER4	Human epidermal growth factor receptor 4
IHC	Immunhistochemie
ISEL	Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer (Studie)
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

N	Anzahl der analysierbaren/auswertbaren Fälle
NP	Nonylphenyl-polyethylenglycol
NR	Nummer
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PH	Pondus Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff ionenkonzentration
PT	Primärtumor
S0023	Southwest Oncology Group, Phase III clinical trial 0023
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (cancer)
SCLC	Small cell lung cancer, kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Saline Sodium Citrate (Natriumchlorid-Citrat-Puffer)
TMA	Tissue Microarray
TRIS	3-N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-hydroxypropansulfonsäure
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
U.S.	United states

Einheiten:

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter

9 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 (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 64(23):8534-8540

Al-Kuraya K, Schraml P, Sheikh S, Amr S, Torhorst J, Tapia C, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Simon R, Sauter G (2005) Predominance of high-grade pathway in breast cancer development of Middle East women. *Mod Pathol.* 18(7):891-897

Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al- Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L (2007) HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 60(7):768-772

Altimari A, Fiorentino M, Gabusi E, Gruppioni E, Corti B, D'Errico A, Grigioni WF (2003) Investigation of ErbB1 and ErbB2 expression for therapeutic targeting in primary liver tumours. *Dig Liver Dis.* 35(5):332-338

Araki K, Ishii G, Yokose T, Nagai K, Funai K, Kodama K, Nishiwaki Y, Ochoiai A (2003) Frequent overexpression of the c-kit protein in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 40(2):173-180

Baselga J, Arteaga CL (2005) Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol.* 23(11):2445-2459

Bolli M, Kocher T, Adamina M, Guller U, Dalquen P, Haas P, Mirlacher M, Gambazzi F, Harder F, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002) Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential

indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma. *Ann Surg.* 236(6):785-793

Bozzetti C, Personeni N, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Negri F, Martella E, Naldi N, Franciosi V, Cascinu S (2003) HER-2/neu amplification by fluorescence in situ hybridization in cytologic samples from distant metastatic sites of breast carcinoma. *Cancer.* 99(5):310-315

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol.* 195(1):72-79

Butnor KJ, Burchette JL, Sporn TA, Hammar SP, Roggli VL (2004) The spectrum of Kit (CD117) immunoreactivity in lung and pleural tumors: a study of 96 cases using a single-source antibody with a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 128(5):538-543

Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Pusztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH, Cristofanilli M, Frye DK, Smith TL, Hunt KK, Singletary SE, Sahin AA, Ewer MS, Buchholz TA, Berry D, Hortobagyi GN (2005) Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(16):3676-3685

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97(9):643-655

- Chung KY**, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB (2005) Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 23(9):1803-1810
- Collier JD**, Guo K, Mathew J, May FE, Bennett MK, Corbett IP, Bassendine MF, Burt AD (1992) C-erbB-2 oncogene expression in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 14(2-3):377-380
- Cottu PH**, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Diéras V, Mignot L, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A (2008) Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 19(3):595-597
- Cunningham D**, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 351(4):337-345
- Dahl E**, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild PJ, Veeck J, Knüchel R, Klopocki E, Sauter G, Simon R, Wieland WF, Walter B, Denzinger S, Hartmann A, Hammerschmied CG (2007) Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumors: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 26(38):5680-5691
- Debiec-Rychter M**, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT; EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (2004) Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer.* 40(5):689-695

- Dei Tos AP** (2007) The biology of epidermal growth factor receptor and its value as a prognostic/ predictive factor. *Int J Biol Markers*. 22(1 Suppl 4):3-9
- Demetri GD**, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H (2002) Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 347(7):472-480
- De Pinieux G**, Colin D, Vincent-Salomon A, Couturier J, Amsellem-Ouazana D, Beuzeboc P, Vieillefond A (2004) Confrontation of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization for the assessment of HER-2/ neu (c-erbB-2) status in urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 444(5):415-419
- Dirnhofer S**, Zimpfer A, Went P (2006) Die diagnostische und prädiktive Bedeutung von Kit (CD117) *Ther Umsch*. 63(4):273-278
- Druker BJ** (2004) Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*. 91:1-30
- Eccles SA**, Welch DR (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*. 369(9574):1742-1757
- Edgerton SM**, Moore D 2nd, Merkel D, Thor AD (2003) ErbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 11(3):214-221
- Ferlay J**, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 18(3):581-592
- Ferretti G**, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F (2007) HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 19(1):56-62

Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol.* 13(7):1036-1043

Gandour-Edwards R, Lara PN Jr, Folkins AK, LaSalle JM, Beckett L, Li Y, Meyers FJ, DeVere-White R (2002) Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer.* 95(5):1009-1015

Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE (2001) Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope.* 111(8):1373-1378

Grimm CF, Blum HE, Geissler M (2005) Tyrosinkinaseinhibitoren in der Tumorthherapie-Teil2. Aktueller Stand und Perspektiven. *Dtsch Med Wochenschr.* 130(23):1438-1442

Hauser-Kronberger C, Peham K, Grall J, Rausch W, Hutarew G, Dietze O (2006) Novel approach of human epidermal growth factor receptor 2 detection in noninvasive and invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 175(3 Pt 1):875-880

Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 21(23):4342-4349

Hirsch Fr, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn PA Jr, Franklin WA, Crowley J, Gandara DR; Southwest Oncology Group (2005) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by

fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 23(28):6838-6845

Hornick JL, Fletcher CD (2007) The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 38(5):679-687

Hoyek-Gebeily J, Nehmé E, Aftimos G, Sader-Ghorra C, Sargi Z, Haddad A (2007) Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: the prognostic value of tumoral markers *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 108(6):482-488

Ito Y, Takeda T, Sasaki Y, Sakon M, Yamada T, Ishiguro S, Imaoka S, Tsujimoto M, Higashiyama S, Monden M, Matsuura N (2001) Expression and clinical significance of the erbB family in intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Pathol Res Pract.* 197(2):95-100

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ (1999) Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol.* 17(7):1974-1982

Kim HJ, Yoo TW, Park DI, Park JH, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim MK, Chae SW, Sohn JH (2007) Gene amplification and protein overexpression of HER-2/neu in human extrahepatic cholangiocarcinoma as detected by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry: its prognostic implication in node-positive patients. *Ann Oncol.* 18(5):892-897

Kolla SB, Seth A, Singh MK, Gupta NP, Hemal AK, Dogra PN, Kumar R (2008) Prognostic significance of Her2/neu overexpression in patients with muscle invasive urinary bladder cancer treated with radical cystectomy. *Int Urol Nephrol.* 40(2):321-327

- Kononen J**, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 4(7):844-847
- Krüger S**, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A (2002) Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int J Oncol.* 21(5):981-987
- Krüger S**, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A (2002) HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int J Cancer.* 102(5):514-518
- La Point RJ**, Bourne PA, Wang HL, Xu H (2007) Coexpression of c-kit and bcl-2 in small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 15(4):401-406
- Latif Z**, Watters AD, Dunn I, Grigor KM, Underwood MA, Bartlett JM (2003) HER2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer.* 89(7):1305-1309
- Latif Z**, Watters AD, Dunn I, Grigor K, Underwood MA, Bartlett JM (2004) HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur J Cancer.* 40(1):56-63
- Lengauer C**, Diaz LA Jr, Saha S (2005) Cancer drug discovery through collaboration. *Nat Rev Drug Discov.* 4(5):375-380
- Lenz HJ**, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK (2006) Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal

carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 24(30):4914-4921

Lipp D (2002) Gewebearrays für die rasche Identifikation von Patienten für neuartige Krebsbehandlungen. Med. Dissertation. Universität Basel

López-Martin A, Ballestín C, Garcia-Carbonero R, Castaño A, Lopez-Ríos F, López-Encuentra A, Sánchez-Céspedes M, Castellano D, Bartolomé A, Cortés-Funes H, Paz-Ares L (2007) Prognostic value of KIT expression in small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 56(3):405-413

Marshall J (2006) Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer.* 107(6):1207-1218

Meric-Bernstam F, Hung MC (2006) Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 12(21):6326-6330

Micke P, Basrai M, Faldum A, Bittinger F, Rönstrand L, Blaukat A, Beeh KM, Oesch F, Fischer B, Buhl R, Hengstler JG (2003) Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 9(1):188-194

Micke P, Hengstler JG, Albrecht H, Faldum A, Bittinger F, Becker K, Wiewrodt R, Fischer B, Buhl R (2004) C-kit expression in adenocarcinomas of the lung. *Tumour Biol.* 25(5-6):235-242

Nakazawa K, Dobashi Y, Suzuki S, Fujii H, Takeda Y, Ooi A (2005) Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol.* 206(3):356-365

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 37 (Suppl 4):9-15

Niehaus J (Unveröffentlicht) Zahnmed. Dissertation. Universität Hamburg

Ono M, Kuwano M (2006) Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res.* 12(24):7242-7251

Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L; REMA (2007) Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol.* 138(1):12-30

Parra HS, Cavina R, Latteri F, Zucali PA, Campagnoli E, Morhengi E, Grimaldi GC, Roncalli M, Santoro A (2004) Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 91(2):208-212

Pérez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabárbara P, Bonomi P (2004) Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 22(16):3238-3247

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353(16):1659-1672

Pisansky TM, Gold DG, Furutani KM, Macdonald OK, McLaren RH, Mynderse LA, Wilson TM, Hebl JR, Choo R (2008) High-dose-rate brachytherapy in the curative treatment of patients with localized prostate cancer. *Mayo Clin Proc.* 83(12):1364-1372

- Press MF**, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ (2005) Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res.* 11(18):6598-6607
- Preto A**, Moutinho C, Velho S, Oliveira C, Rebocho AP, Figueiredo J, Soares P, Lopes JM, Seruca R (2007) A subset of colorectal carcinomas express c-KIT protein independently of BRAF and/or KRAS activation. *Virchows Arch.* 450(6):619-626
- Reed J**, Ouban A, Schickor FK, Muraca P, Yeatman T, Coppola D (2002) Immunohistochemical staining for c-Kit (CD117) is a rare event in human colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer.* 2(2):119-122
- Reid A**, Vidal L, Shaw H, de Bono J (2007) Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *Eur J Cancer.* 43(3):481-489
- Rocha-Lima CM**, Soares HP, Raez LE, Singal R (2007) EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control.* 14(3):295-304
- Rohr UP**, Rehfeld N, Pflugfelder L, Geddert H, Müller W, Steidl U, Fenk R, Gräf T, Schott M, Thiele KP, Gabbert HE, Germing U, Kronenwett R, Haas R (2004) Expression of the tyrosine kinase c-kit is an independent prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 111(2):259-263
- Romond EH**, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353(16):1673-1684

- Rossi G**, Cavazza A, Marchioni A, Migaldi M, Bavieri M, Facciolongo N, Petruzzelli S, Longo L, Tamberi S, Crinò L (2003) Kit expression in small cell carcinomas of the lung: effects of chemotherapy. *Mod Pathol.* 16(10):1041-1047
- Rubin BP**, Heinrich MC, Corless CL (2007) Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet.* 369(9574):1731-1741
- Ruiz C**, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer.* 118(9):2190-2194.
- Sauter G**, Mirlacher M (2002) Tissue microarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol.* 55(8):575-576
- Sauter G**, Simon R, Hillan K (2003) Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2(12):962-972
- Sauter G**, Moch H, Mihatsch M (2004) Prädiktive molekulare Pathologie oder das Titanic-Szenario. *Schweiz Med Forum.* 1/2: 26-28
- Schultze JL** (2006) Voraussetzungen für die Entwicklung einer zielgerichteten, molekular definierten Therapie in der Onkologie. *Med Klin (München).* 101(8):617-623
- Shibahara H**, Tamada S, Higashi M, Goto M, Batra SK, Hollingsworth MA, Imai K, Yonezawa S (2004) MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. *Hepatology.* 39(1):220-229
- Simon R**, Nocito A, Hübscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Moch H, Wilber K, Schötzau A, Kononen J, Sauter G (2001) Patterns

of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(15):1141-1146

Simon R, Atefy R, Wagner U, Forster T, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2003) HER-2 and TOP2A coamplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer.* 107(5):764-772

Singer CF, Hudelist G, Lamm W, Mueller R, Czerwenka K, Kubista E (2004) Expression of tyrosine kinases in human malignancies as potential targets for kinase-specific inhibitors. *Endocr Relat Cancer.* 11(4):861-869

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 235(4785):177-182

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(4905):707-712

Stenner-Liewen F, Zippelius A, Pestalozzi BC, Knuth A (2006) Molekular zielgerichtete Therapie. *Chirurg.* 77(12):1118-1125

Tanner M, Järvinen P, Isola J (2001) Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 61(14):5345-5348

Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G (2007) Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol.* 20(2):192-198

Tapia C, Savic S, Wagner U, Schönegg R, Novotny H, Grilli B, Herzog M, Barascud AD, Zlobec I, Cathomas G, Terracciano L, Feichter G, Bubendorf L (2007) HER2

gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res.* 9(3):R31

Terada T, Ashida K, Endo K, Horie S, Maeta H, Matsunaga Y, Takashima K, Ohta T, Kitamura Y (1998) C-erbB-2 protein is expressed in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Histopathology.* 33(4):325-331

Tischhoff I, Tannapfel A (2007) Hepatozelluläres Karzinom und Cholangiokarzinom. Unterschiedliche Prognose, Pathogenese und Therapie. *Zentralbl Chir.* 132(4):300-305

Toschi L, Cappuzzo F (2007) Understanding the new genetics of responsiveness to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncologist.* 12(2):211-220

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Sheperd FA (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 353(2):133-144

Ukita Y, Kato M, Terada T (2002) Gene amplification and mRNA and protein overexpression of c-erbB-2 (HER-2/neu) in human intrahepatic cholangiocarcinoma as detected by fluorescence in situ hybridization, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Hepatol.* 36(6):780-785

Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, van Oosterom A, Hogendoorn PC, Van Glabbeke M, Bertulli R, Judson I (2004) Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet.* 364(9440):1127-1134

- Went PT**, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G (2004) Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol.* 22(22):4514-4522
- Yamada K**, Iwai K, Okada Y, Mori M (1989) Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in salivary gland tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 415(6):523-531
- Yoshikawa D**, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T (2008) Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer.* 98(2):418-425
- Zaharieva BM**, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Wilber K, Hering F, Schönenberger A, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva DI (2003) High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. *J Pathol.* 201(4):603-608
- Zhang D**, Salto-Tellez M, Do E, Putti TC, Koay ES (2003) Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol.* 34(4):362-368
- Zhang H**, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 117(8):2051-2058
- Zheng J**, Zhu YM (2007) Expression of c-erbB-2 proto-oncogene in extrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6(4):412-415

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Guido Sauter, dessen unvergleichlich wohlwollende und kontinuierliche Unterstützung diese Arbeit maßgeblich trug und gestaltete. Ein weiterer Dank sei an PD Dr. rer. nat. Ronald Simon gerichtet, der mir bei der Auswertung der Untersuchungsergebnisse eine große und wertvolle Hilfe war. Vielen Dank auch an das enorme Engagement des Laborteams, allen voran Frau Martina Mirlacher und Frau Sylvia Schnöger. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Assistenzärzten des Instituts für Pathologie, die mich bei der Auswahl geeigneter Stanzbiopsien tatkräftig unterstützt und mir den Einstieg in die Archivarbeit sehr erleichtert haben.

Des Weiteren ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie: Frau Christiane Hundsichler für ihr großartiges Motivationstalent und ihre kompetente Unterstützung zu jedem Zeitpunkt, Herrn Hans Gruber für das schnelle und unermüdliche Korrigieren meiner Rechtschreibkunst sowie meinen Geschwistern Nike Jambor und Valentin Hundsichler, ohne die das Leben nur halb so schön wäre.

Ebenso danke ich meiner Kommilitonin und Freundin Gudrun Schuhmann für die wiederholte Hilfestellung bei der Bildbearbeitung und Herrn Udo Winkenjohann für die grandiose Unterstützung bei der Finalisierung dieser Arbeit.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eidesstattliche 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.

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: Daria Katharina Dekassian