

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
und  
Institut für Pathologie des GSF-Forschungszentrums München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)**

## **Mammakarzinom: Histopathologische und prognostische Bedeutung der Gene HER- 2/neu, GRB-7 und PTK-6**

**Dominique Ritterswürden**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. M. M. Aubele  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 08.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 27.01.2010 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 Ätiologie und Risikofaktoren</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Klassifikation</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Morphologische Klassifikation .....	8
1.3.2 Histopathologische Klassifikation.....	9
<b>1.4 Genetik von Mammakarzinomen</b> .....	<b>9</b>
1.4.1 Tumorentstehung allgemein.....	9
1.4.2 Hereditäres Mammakarzinom.....	9
1.4.3 Somatische genetische Veränderungen beim Mammakarzinom .....	10
<b>1.5 Prognosefaktoren</b> .....	<b>11</b>
1.5.1 Allgemein .....	11
1.5.2 Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz .....	11
1.5.2.1 pTMN-Status.....	11
1.5.2.2 Morphologie/Histopathologie .....	12
1.5.2.3 Rezeptorstatus .....	12
1.5.2.4 HER-2/neu.....	13
1.5.2.4.1 Diagnostik .....	14
1.5.2.4.2 HER-2/neu-Antikörpertherapie.....	14
1.5.2.4.3 Ausblick .....	15
1.5.3 Neue/potentielle Prognosefaktoren .....	15
1.5.3.1 GRB-7 .....	15
1.5.3.2 PTK-6.....	16
<b>2 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>19</b>
3.1.1 Gewebe und Patientenkohorte.....	19
3.1.2 FISH – Sonden .....	19
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.2.1 Herstellung der Tissue Mikroarrays.....	20
3.2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	20
3.2.2.1 Verwendete Reagenzien.....	20
3.2.2.2 Hybridisierung.....	21
3.2.3 Apotome .....	21
3.2.3.1 Bildverarbeitung.....	22
3.2.3.2 Auszählung Signale.....	23
3.2.3.2.1 HER-2/neu – Sonde.....	23

3.2.3.2.2	GRB-7 Sonde .....	25
3.2.3.2.3	Sonden für das PTK-6-Gen und Zentromer 20 .....	27
3.2.4	Statistik.....	30
3.2.4.1	p-Werte.....	30
3.2.4.2	Spearmanischer Rangkorrelationskoeffizient.....	30
3.2.4.3	Kaplan-Meier Methode .....	30
3.2.4.4	Log-Rang- $\chi^2$ -Test.....	31
3.2.4.5	Multivariate Analysen mit Cox „proportional hazards“ Regression.....	31
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Signalhäufigkeiten.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Korrelation der Zellparameter untereinander.....</b>	<b>33</b>
4.2.1	Korrelationen der untersuchten FISH-Parameter untereinander.....	33
4.2.2	Korrelation der FISH-Parameter mit weiteren vorhandenen Zellmerkmalen.....	34
4.2.2.1	Korrelation der FISH-Parameter mit der mRNA .....	34
4.2.2.2	Korrelation der FISH-Parameter mit der Immunhistochemie.....	34
<b>4.3</b>	<b>Korrelation der FISH-Parameter mit klinisch-histopathologischen Merkmalen</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen.....</b>	<b>36</b>
4.4.1	Univariate Analyse .....	36
4.4.2	Multivariate Analyse .....	42
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchte Gene .....</b>	<b>46</b>
5.1.1	HER-2.....	46
5.1.2	GRB-7 .....	51
5.1.3	PTK-6.....	54
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>75</b>
<b>8.1</b>	<b>Klinische Verlaufsdaten der Patientinnen .....</b>	<b>75</b>
<b>8.2</b>	<b>pTMN-Klassifikation des Mammakarzinoms .....</b>	<b>76</b>
<b>8.3</b>	<b>WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome .....</b>	<b>77</b>
<b>8.4</b>	<b>Protokoll zur Durchführung der FISH- (Fluoreszenz in-situ Hybridisierungs) Technik.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>79</b>

**10**    **LEBENSLAUF** ..... **80**

## Verzeichnis der Abkürzungen

ABI	Firma Applied Biosystems (Weiterstadt)
Akt	Serin/Threonin Kinase
CGH	Comparative Genomic Hybridization
DAPI	Diaminobenzidin (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GRB-7	Growth factor receptor-bound protein-7
H&E	Hämatoxin-Eosin-Färbung
HER-2/neu	Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus der Familie der Wachstumsfaktoren ( <u>h</u> uman <u>e</u> pithelial growth factor <u>r</u> eceptor-2)
IDC	Invasiv duktales Karzinom
iRNA	interference Ribonukleinsäure
JÜR	Jahres Überlebens Rate
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
M	mol/Liter
mM	millimol/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
PAC-Klon	Ein Vektor zum Klonieren von DNA-Fragmenten (100-300 kb) in Escherichia coli, basierend auf dem Bakteriophagen P1 Genom.
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFDN4	Prefoldin 4
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PTK-6	Protein tyrosine kinase 6
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSC	Standard Sodium Citrat

Taq DNA Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*  
(extrem hitzestabil)

WHO World Health Organization

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr der häufigste bösartige Tumor der Frau (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Betrachtet man die altersstandardisierte Inzidenz im internationalen Vergleich, so erkranken in Industriestaaten wesentlich mehr Frauen an Brustkrebs als in industriell weniger entwickelten Ländern (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Im Jahr 2002 erkrankten in Deutschland 55150 Frauen neu an Brustkrebs, was 26,8% aller weiblichen Krebserkrankungen entsprach (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Nach Daten des Tumorregisters München wird die Anzahl der invasiven Mammakarzinome jedoch bei über 60000 Neuerkrankungen pro Jahr vermutet. Das mittlere Erkrankungsalter liegt etwa bei 63,5 Jahren.

Auch bezüglich der krebsbedingten Mortalität ist das Mammakarzinom nach Daten der amtlichen Todesursachenstatistik in Deutschland weit oben auf der Liste. Im Jahr 2005 war es für 17455 Sterbefälle verantwortlich (17,6% der tumorbedingten Mortalität). In der Todesursachenstatistik für Frauen des Statistischen Bundesamtes lag das Mammakarzinom im Jahr 2006 nach der ischämischen Herzkrankheit, der Herzinsuffizienz, dem akuten Myokardinfarkt und dem Schlaganfall auf Rang 5 (Statistisches Bundesamt Stand 10/2006). Schätzungsweise bekommt in Deutschland etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens die Diagnose Brustkrebs (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Im Jahr 2006 waren laut Daten des Statistischen Bundesamtes bösartige Neubildungen der Brustdrüse nach der Herzinsuffizienz der zweithäufigste Grund für einen Krankenhausaufenthalt bei Frauen (n=147000). Die relative 5-Jahres-Überlebenszeit beträgt nach aktuellen Schätzungen über alle Tumorstadien gesehen 79% (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2006). Dies stellt eine Verbesserung gegenüber den Ergebnissen der EUROCORE-3-Studie dar, bei der das relative 5-Jahres-Überleben nur auf 75,4% geschätzt wurde (Sant et al., 2003).

## 1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt, es kann aber davon ausgegangen werden, dass hereditäre Störungen, Umweltfaktoren und hormonelle Störungen eine Rolle spielen (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Bei Frauen unter 20 Jahre gibt es weniger als 10 Fälle pro 100000 Frauen, ab einem Alter von 45 Jahren steigt die Inzidenz

jedoch rapide an (Hulka et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass Ovarialhormone die Entstehung von Brustkrebs beeinflussen (Pike et al., 1993), weshalb alle Faktoren, die einen hohen bzw. über lange Zeiten erhöhten Östrogenspiegel begünstigen, Risikofaktoren für das Mammakarzinom darstellen. Zu diesen Faktoren zählen u.a.: Frühe Menarche (< 12 Jahre), späte Menopause (nach dem 55. Lebensjahr), Kinderlosigkeit, eine späte Erstgeburt (> 30 Jahre) und Adipositas (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004).

Auch der sogenannte „lifestyle“ scheint Einfluss auf die Entwicklung von Brustkrebs zu nehmen. So gehen Adipositas, Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung und häufiger Alkoholkonsum mit einem erhöhten Krankheitsrisiko einher, während eine Ernährung mit viel Obst und Gemüse sowie ausreichende körperliche Aktivität das Brustkrebsrisiko verringern. Eine protektive Wirkung haben außerdem eine frühe erste Geburt, zahlreiche Geburten und langes Stillen (Dumitrescu et al., 2005). Noxen, wie z.B. ionisierende Strahlung oder chemische Substanzen erhöhen ebenfalls das Erkrankungsrisiko.

Auch Frauen, in deren Familie bereits Brustkrebs vorgekommen ist, tragen, abhängig vom Verwandtschaftsgrad, ein höheres Risiko (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Die Vererbung einer Suszeptibilität basiert auf Keimbahnmutationen. Die in Betracht kommenden Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2 sind in Kapitel 1.4.2., S.9, erläutert.

Parkin et al. konnten 1999 zeigen, dass neben den oben genannten Faktoren auch das Herkunftsland der Patientinnen eine Rolle spielt. Frauen aus dem Fernen Osten, Afrika und Südamerika erkranken demnach bis zu 8-mal seltener an Brustkrebs als Frauen in Nord Amerika und Nord Europa (Parkin et al., 1999). Außerdem zeigt sich bei Frauen aus den USA und aus Schweden nach dem 45. Lebensjahr ein signifikanter linearer Anstieg des Erkrankungsrisikos bis über das 60. Lebensjahr hinaus, während das Risiko japanischer Frauen mit 45 Jahren ein Plateau erreicht und nach dem 70. Lebensjahr sogar abnimmt (Hulka et al., 2001).

## **1.3 Klassifikation**

### **1.3.1 Morphologische Klassifikation**

Als Mammakarzinom werden maligne Tumoren bezeichnet, die von Epithelien der Milchgänge oder den lobulären Drüsenendstücken ausgehen (duktale bzw. lobuläre Karzinome). Darüber hinaus werden invasive und nicht-invasive Karzinome unterschieden. In-situ-Karzinome können sich in invasive Karzinome weiterentwickeln und lymphogen und/oder hämatogen metastasieren. Das invasiv-duktale Karzinom ist mit 80 % der häufigste



Typ der invasiven Mammakarzinome (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Eine detailliertere WHO-Klassifikation befindet sich in Anhang 3.

### **1.3.2 Histopathologische Klassifikation**

Postoperativ werden die Mammakarzinome in die pTNM-Klassifikation eingeteilt. T bezieht sich auf die Tumorgröße, N auf den Lymphknotenstatus und M auf vorhandene Metastasen, ihre Lokalisation und ihre Anzahl (siehe Anhang 2). Außerdem werden die Tumore in 3 histologische Differenzierungsgrade eingeteilt (Elston CW, Ellis IO, 1991).

## **1.4 Genetik von Mammakarzinomen**

### **1.4.1 Tumorentstehung allgemein**

Die monoklonale Entwicklungstheorie besagt, dass sich ein Tumor in mehreren Schritten (Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung) durch Transformation (z.B. Defekte in verschiedenen Genen) aus einer einzelnen Zelle heraus entwickelt. Neben Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen werden verschiedene Umwelteinflüsse diskutiert, durch welche diese Transformation bewirkt oder verstärkt wird. Einige Beispiele sind der Kontakt zu chemischen Verbindungen (Tabak, Asbest, etc.), die Ernährung, chronische Infektionen (z.B. Helicobacter pylori, humane Papillom-Viren) und Strahlen. Durch die Transformation erhält die Zelle ein abnormes Potential, z.B. kann sie unkontrolliert wachsen, sich aus ihrem Zellverband herauslösen und invasiv in umliegendes Gewebe einwachsen. Dadurch ist es dem entarteten Zellklon möglich, über das Lymph- oder Blutgefäßsystem in andere Organe zu gelangen (= Metastasierung) (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Diese Mechanismen sind auf molekularer Ebene sehr komplex und noch wenig verstanden.

### **1.4.2 Hereditäres Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom ist in etwa 5 – 10% eine erbliche familiäre Krebserkrankung (Honrado et al., 2005) was bedeutet, dass diese Patientinnen eine vererbte Mutation im Genom der Keimzellen aufweisen. Patientinnen mit dieser Mutation leiden unter einem früheren Krankheitsbeginn und ihre Nachkommen und Verwandten müssen mit einem höheren Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, rechnen (Claus et al., 1996). Die vererbte Mutation liegt dann in allen Körperzellen der betroffenen Menschen vor. Gemäß der „two-hit“ Hypothese, die von Alfred Knudson 1971 formuliert wurde (Knudson, 1971), ist meist nur ein

Allel betroffen. Tritt jedoch im zweiten Allel eine somatische Mutation auf, wird die Funktion des Gens verändert oder fällt ganz aus. Falls diese Mutation in einem der sogenannten Tumorsuppressorgene stattfindet, wird dadurch die supprimierende Regulation des Zellwachstums gestört und der Zellklon kann unkontrolliert proliferieren (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Beim Mammakarzinom sind die Tumorsuppressorgene BRCA1, BRCA2, p53, p27, Skp2, PTEN, ATM und Rb relevant (Osborne et al., 2004). Wenn die Mutation auf den Genen BRCA1 (Breast Cancer 1, Chromosom 17q21) oder BRCA2 (Breast Cancer 2, Chromosom 13q12) liegt, wird von einem familiären Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom gesprochen. Es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass dieses Syndrom für ca. 80-90% aller hereditären Mammakarzinome verantwortlich sei (Greene, 1997). Erst neuere Arbeiten zeigten, dass in diesen Studien die Prävalenz der BRCA1/BRCA2 Mutationen überschätzt wurde und die Mutation lediglich für ca. 17 % der hereditären Krankheitsfälle verantwortlich ist (Anglian Breast Cancer Study Group, 2000). Nicht nur beim hereditären Mammakarzinom spielen die oben beschriebenen Gene eine Rolle, sondern auch beim sporadisch auftretenden Mammakarzinom (Review Osborne et al., 2004).

#### **1.4.3 Somatische genetische Veränderungen beim Mammakarzinom**

Anders als bei Keimbahnmutationen betreffen somatische oder sporadische genetische Veränderungen nicht alle Zellen im Körper, sondern nur einzelne Zellen. Wenn die DNA dieser einzelnen Zellen auf Grund von defekten Steuermechanismen nicht repariert wird, können sich aus diesen, nach der in Kapitel 1.4.1. beschriebenen monoklonalen Entwicklungstheorie, Tumorzellen entwickeln (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Neben den oben erwähnten Tumorsuppressorgenen kommt vor allem Onkogene eine entscheidende Bedeutung zu. Sie entstehen aus sogenannten Protoonkogenen, welche durch Genamplifikation, chromosomale Translokation, Punktmutation oder Deregulation der Expression aktiviert werden. Aktivierte Onkogene sind dominant und wachstumsstimulierend, sie bewirken unkontrolliertes Zellwachstum sowie deregulierte Differenzierungsprozesse. Sie können in vier Gruppen eingeteilt werden: a) autokrine Wachstumsfaktoren und Wachstumsrezeptorfaktoren, b) Elemente der intrazellulären Signaltransduktion, c) Transkriptionsfaktoren und d) Zykline (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Das HER-2/neu Gen, welches einen elementaren Teil dieser Arbeit darstellt, gehört zu den Wachstumsrezeptorfaktoren und wird in Kapitel 1.5.2.4. näher beschrieben.

Wie bereits erwähnt ist die Genamplifikation ein Aktivierungsmechanismus für Protoonkogene. Beim Mammakarzinom wurden bisher mehr als 80 Genamplifikationen identifiziert (Beckmann et al., 1997).

Eine bewährte Screening-Methode, mit deren Hilfe amplifizierte Chromosomenregionen sowie DNA-Verluste im Genom detektiert werden können, ist die CGH (Comparative Genomic Hybridisation). Anne Kallionemi und ihre Mitarbeiter fanden 1994 26 amplifizierte Regionen, ein Jahr später gelang es der Arbeitsgruppe um Isola sogar 55 verschiedene Veränderungen zu identifizieren (Kallionemi A. et al, 1994, Isola et al., 1995). Die meisten Veränderungen wurden an den Chromosomen 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 17q, 20p, und 20q gefunden. Sie gehen beim Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit einher (Isola et al., 1995).

## **1.5 Prognosefaktoren**

### **1.5.1 Allgemein**

Prognosefaktoren werden bestimmt, um den individuellen Krankheitsverlauf jeder Patientin bereits vor Therapiebeginn möglichst genau abzuschätzen. Im Mammakarzinom-Manual des Tumorzentrums München werden sie von den prädiktiven Faktoren unterschieden, welche das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie voraussagen. Zu den Prognosefaktoren gehören unter anderem: der pTNM-Status des Tumors, der histopathologische Typ und der Differenzierungsgrad sowie andere biologische Kriterien (z.B. Vorhandensein von Steroidhormonrezeptoren etc.). Es wird gemeinhin zwischen den Faktoren, deren Bedeutung in unabhängigen Studien auch mit multivariaten Analyseverfahren belegt ist (den sogenannten klassischen Faktoren), und den Faktoren, deren Einfluss noch nicht mit gleicher Evidenz belegt ist (den sogenannten neueren tumorbiologischen Faktoren) unterschieden (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007).

### **1.5.2 Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz**

#### **1.5.2.1 pTMN-Status**

Der wichtigste Faktor für die Prognose ist die Ausbreitung des Tumors. Entscheidend ist dabei die Tumorgöße (Tumoren <1 cm haben zum Beispiel eine günstige Prognose, solche >4 cm eine schlechte), der Lymphknotenstatus und die Fernmetastasierung. Diese drei Faktoren werden in der pTMN-Klassifikation zusammengefasst (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Der axilläre Lymphknotenstatus ist bis jetzt der stärkste Prognosefaktor

beim Mammakarzinom. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert direkt mit dem Rezidivrisiko und dem Mortalitätsrisiko. Ebenso zählt die Tumorgroße zu den gesicherten Prognosefaktoren; zwischen der Größe des Primärtumors und dem axillären Lymphknotenbefall besteht eine positive Korrelation (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007).

#### 1.5.2.2 **Morphologie/Histopathologie**

Morphologische Kriterien (der Tumortyp) haben ebenfalls große prognostische Bedeutung. So haben die invasiven duktales Karzinome die schlechteste 10-Jahres-Überlebensrate (10-JÜR) mit nur 30%, wohingegen Sonderformen wie die tubulären oder die papillären Karzinome eine signifikant bessere Prognose haben (10-JÜR bei 60%) (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Hat der Tumor die Schranke zu Lymph- oder Blutgefäßen durchbrochen, ist die Prognose sehr ungünstig (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007), ebenso wenn die Mamille oder die Haut betroffen sind (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Das histologische Grading ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor. Es werden heute drei verschiedene Malignitätsgrade unterschieden. Höhere Malignitätsgrade korrelieren mit einer höheren Rezidiv- und Metastasenrate und damit mit einer schlechteren Überlebensrate (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004).

#### 1.5.2.3 **Rezeptorstatus**

Beim Mammakarzinom wird grundsätzlich der Steroidhormon-Rezeptorstatus bestimmt. Seine prognostische Vorhersagekraft ist stark von der angewandten adjuvanten Therapie abhängig und nimmt mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab. Er gilt deshalb vor allem aufgrund seiner prädiktiven Bedeutung als therapierelevanter Faktor (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Nach der 11. Internationalen Konsensuskonferenz über adjuvante Therapie des primären Mammakarzinoms in St. Gallen 2007 wird eine Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorexpression als Faktor für ein geringes Risiko eingestuft (Goldhirsch et al., 2007). Dort wird außerdem das Alter als Risikofaktor bewertet: Patientinnen, die mit <35 Jahren an einem Mammakarzinom erkranken, haben demnach eine schlechtere Prognose als solche, die bei Erkrankungsbeginn >35 Jahre alt sind.

#### 1.5.2.4 HER-2/neu

HER-2/neu ist ein transmembraner Wachstumsfaktor-Rezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. Er ist in ca. 20-30% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert, was in der Mehrzahl dieser Fälle (ca. 90%) auf eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens zurückzuführen ist (Slamon et al., 1987 u. 1989, Pauletti et al., 1996). Dies geht in der Regel mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung (Slamon et al., 1987 u. 1989) und einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus einher (Konecny G et al., 2003).

Die HER-Rezeptor-Familie besteht aus vier sich sehr ähnelnden Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER-1/EGFR/erbB1; HER-2/neu/erbB2; HER-3/erbB3; HER-4/erbB4). Sie sind alle in der Zellmembran lokalisiert und können in vielen verschiedenen Geweben gefunden werden. Sie interagieren mit einer Reihe von Liganden, die, ähnlich wie EGF, konservierte Cystein-reiche Domänen aufweisen (Tzahar et al., 1998).

Die HER-Rezeptoren liegen als Monomere vor. Bindet ein Ligand, formen sie Rezeptordimere, entweder Homodimere (z.B. HER-1-HER-1) oder Heterodimere (z.B. HER-1-HER-2). Durch die dadurch entstehende räumliche Nähe der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen werden diese autophosphoryliert, was zur Aktivierung einer Signalkaskade führt (Natha et al., 2006).

Im Gegensatz zu den Monomeren weisen die Dimere eine höhere Stabilität auf (Alroy et al., 1997). Von den zehn verschiedenen möglichen Dimer-Kombinationen liegen diejenigen, die HER-2 enthalten, am längsten im aktiven Zustand vor. Sie lösen die stärksten Signalkaskaden aus (Rubin 2001), weshalb sie verstärkt mit malignem Zellwachstum assoziiert werden. Die Homo- oder Heterodimere, die aus den anderen Mitgliedern der HER-Familie gebildet werden, lösen nur schwache Signalkaskaden aus und führen daher, selbst bei Überexpression, sehr selten zu Tumorwachstum.

Auf Grund seiner molekularen Struktur ist HER-2 der bevorzugte Bindungspartner in Heterodimeren. Je mehr HER-2 in der Zelle vorliegt, desto mehr HER-2-Dimere werden gebildet. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden resultieren in malignem Wachstum der Zelle (Rubin et al., 2001).

Ob eine HER-2/neu-Überexpression eine unabhängige prognostische Relevanz aufweist, konnte, trotz einer Metaanalyse und über 200 Berichten über das Thema, noch nicht endgültig geklärt werden (Yamauchi et al., 2001). Wesentlich ist jedoch, dass ein positiver HER-2/neu-Status prädiktiv für das Ansprechen auf eine systemische Therapie mit dem monoklonalen

HER-2 spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Inc., South San Francisco, CA) ist (Yamauchi et al., 2001).

#### 1.5.2.4.1 Diagnostik

Der HER-2/neu-Rezeptorstatus wird routinemäßig im Rahmen der Primärdiagnostik des Mammakarzinoms geprüft. Dafür wird ein immunhistochemischer Standardtest (Herceptest, Fa. Dako) verwendet (Wolff et al., 2007). Ein Ergebnis von 0, oder 1+ spricht für keine oder normale Expression, 3+ spricht dagegen eindeutig für eine Überexpression des Rezeptors. Bei unklarem Status (2+) sollte eine genauere Differenzierung erfolgen, da ausschließlich Patientinnen mit positivem HER-2/neu-Status von einer Trastuzumab-Therapie in adjuvanter oder neoadjuvanter Situation profitieren. Als Goldstandard gilt hier die Differenzierung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Ergebnisse einer Differenzierung mittels Chromogene in-situ-Hybridisation (CISH) korrelierten in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Pothos et al. zu 100% mit den FISH-Ergebnissen. CISH wird allerdings noch nicht routinemäßig eingesetzt und zeigt auch keine wesentlichen Vorteile gegenüber FISH (Pothos et al., 2008).

Ebenso gelten die Hormonrezeptoren als prädiktive Faktoren, die routinemäßig bei der Diagnose bestimmt werden. Wenn ein Mammakarzinom Östrogenrezeptoren exprimiert, spricht es normalerweise auf eine Therapie mit Antiöstrogenen (z.B. Tamoxifen) an. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine zusätzlich vorliegende HER-2/neu Überexpression mit einer schlechten Ansprechrate auf eine Therapie mit Tamoxifen assoziiert ist (Wright et al., 1992, Borg et al., 1994, Carlomagno et al., 1996). Im Gegensatz dazu kann davon ausgegangen werden, dass Tumore, die dieses Onkogen überexprimieren, auf Chemotherapie, besonders mit Anthracyclinen, besser ansprechen (Muss et al., 1994).

#### 1.5.2.4.2 HER-2/neu-Antikörpertherapie

Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Inc., South San Francisco, CA) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das HER-2/neu-Onkoprotein gerichtet ist. Er ist seit September 1998 beim metastasierten Mammakarzinon sowie auch seit 2006 in der adjuvanten Therapie zugelassen. Leider zeigte sich in den letzten Jahren, dass bei vielen der Patientinnen, die mit einer Trastuzumabmonotherapie behandelt wurden, trotzdem Metastasen auftraten. Es wurden Studien veröffentlicht, in denen die primäre Resistenz für Trastuzumab bei HER-2 überexprimierenden metastasierten Mammakarzinomen bei 66-89% lag (Natha et al., 2006).

Der HER-2-Rezeptor ist daher immer noch ein guter prädiktiver Wert für das Ansprechen auf die Therapie mit Herceptin®, jedoch ist bislang unklar, woran das relativ hohe Therapieversagen liegen könnte. Außerdem kann Trastuzumab, vor allem in Verbindung mit einer Anthrazyklintherapie, kardiotoxische Auswirkungen haben. In einer Studie von Slamon et al (2001) litten 5% der Patientinnen, die ausschließlich mit Trastuzumab behandelt wurden, an kardiotoxischen Auswirkungen, bei einer Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Trastuzumab waren es 13%, bei einer Kombination von Anthrazyklinen, Cyclophosphamid und Trastuzumab sogar 27% (Slamon et al., 2001). Die auftretende Herzinsuffizienz kann jedoch mit herkömmlicher Herzinsuffizienztherapie gut behandelt werden und ist mindestens teilweise reversibel, so dass sie keine Kontraindikation für einen Therapieversuch mit Trastuzumab darstellen sollte (Keefe, 2002).

#### 1.5.2.4.3 Ausblick

Luoh identifizierte in einer Studie im Jahre 2002 ein über 300 kD großes Kernsegment des 17q12-21 Amplikons, welches in verschiedenen Brustkrebs Zelllinien amplifiziert vorlag. Diese Region beinhaltete 13 amplifizierte Gene. RT-PCR (real time polymerase chain reaction) an sechs Zelllinien zeigte, dass eine fast 100%ige Korrelation zwischen der Amplifikation und der Überexpression von 11 (CRK7, PPARBP, PNMT, TCAP, MGC9753 (PERLD1), MLN64, ERBB2, GRB-7, ZNFN1A3, PSMD3, and TRAP100 (THRAP4)) dieser Gene vorlag (Luoh, 2002).

Im Jahre 2003 konnten Kauraniemi und seine Mitarbeiter zeigen, dass dieses Amplikon im Rahmen einer HER-2/neu Amplifikation meist, wenn nicht immer, ebenfalls amplifiziert vorliegt (Kauraniemi et al., 2003). Die Gene, die auf diesem Amplikon liegen, könnten ebenfalls zum onkogenen Potential des überexprimierten Proteins beitragen und bieten einen potentiellen Angriffspunkt für neue Medikamente. Auf eines von ihnen, GRB-7, wird als potentieller prognostischer und prädiktiver Faktor im nächsten Abschnitt dieser Arbeit eingegangen.

### 1.5.3 Neue/potentielle Prognosefaktoren

#### 1.5.3.1 GRB-7

GRB-7 (Growth factor receptor-bound protein-7) ist ein Adaptormolekül, das die Signaltransduktion von mutiplen Rezeptoren auf der Zellmembran zu verschiedenen nachgeschalteten Signaltransduktionswegen (Pathways) vermittelt (Shen et al., 2004). Das

humane GRB-7-Gen liegt auf Chromosom 17q11-21 in der unmittelbaren Nähe des HER-2/neu-Gens und ist ein Mitglied der GRB-7/-10/-14 Familie. Es ist an vielen wichtigen zellulären und physiologischen Funktionen wie Signaltransduktion und Zellbeweglichkeit sowie an Tumorprogression beteiligt. Bei Ösophaguskarzinomen konnte eine GRB-7 Überexpression mit einem invasiveren Phänotyp und aggressiverer Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Tanaka et al., 1997 und 2000).

GRB-7 ist Teil des HER-2/neu Amplikons und ist in den meisten, wenn nicht allen Mammakarzinomen mit 17q11-21 Amplifikation co-amplifiziert (Kauraniemi et al., 2001 und 2003, Luoh, 2002). Eine Amplifikation von HER-2/neu und GRB-7 geht fast immer mit einer Überexpression der entsprechenden Proteine einher (Kauraniemi et al., 2006).

Dass eine GRB-7-Protein-Überexpression eine Auswirkung auf das HER-2/neu Protein hat, wird schon sehr lange vermutet, der genaue Mechanismus konnte jedoch noch nicht geklärt werden (Stein et al., 1994). Bai et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Überexpression des GRB-7 Proteins für die Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung von HER-2/neu notwendig ist (Bai et al., 2008).

Von den Patientinnen mit HER-2/neu positivem metastasiertem Mammakarzinom sprechen nur 11-34 % auf die Therapie mit Herceptin® an (Natha et al., 2006). Für Patientinnen ohne Metastasen im frühen Stadium ihrer Krankheit liegt die Reduktion der Rezidivwahrscheinlichkeit lediglich bei ca. 40% (Romond et al., 2005, Piccart-Gebhart et al., 2005). Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, dass dringend neue, effektivere Therapien benötigt werden. GRB-7 spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei Brustkrebs mit Amplifikation des 17q11-21 Amplikons und muss auf seine Qualitäten als neues therapeutisches Ziel weiter getestet werden.

### 1.5.3.2 PTK-6

Das Gen der zytoplasmatischen, rezeptorlosen Tyrosinkinase (BRK, *breast kinase*; PTK-6, *protein tyrosine kinase-6*) wurde ursprünglich aus einem menschlichen metastasierten Mammakarzinom geklont (Mitchell et al., 1994). In normalem Brustdrüsengewebe ist ihr Protein nicht oder nur gering detektierbar, in ca. 65% der menschlichen Mammakarzinome und Brustkrebszelllinien ist es jedoch überexprimiert (Aubele et al., 2007). Dies weist darauf hin, dass seine Überexpression die Karzinogenese beeinflussen könnte. Die höchsten Levels an PTK-6 Expression zeigen fortgeschrittene und metastasierte Mammakarzinome (Mitchell et al, 1994).



In normalem Gewebe scheint das Vorkommen von PTK-6 auf differenzierte Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts und der Haut (Vasioukhin et al., 1995, Llor et al., 1999) sowie der Prostata (Derry et al., 2003) beschränkt zu sein, in etwa 2/3 der invasiven Mammakarzinome ist PTK-6 überexprimiert und auf statistisch signifikante Weise mit einer HER-2/neu Überexpression assoziiert (Born et al., 2005; Aubele et al., 2007 und 2008). Außerdem korreliert in Brustkrebsgewebe eine Überexpression der PTK-6-mRNA positiv mit dem Hormonrezeptorstatus (Zhao et al., 2003) und einer HER-2/neu Überexpression (Born et al., 2005). Diese Hinweise sprechen für eine Beziehung zwischen PTK-6 und dem Differenzierungsgrad.

Mehrere *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass PTK-6 möglicherweise eine Rolle in der Signaltransduktionsmodulierung der Rezeptortyrosinkinasen spielt: Überexpression von PTK-6 führt zur Phosphorylierung von HER-3 und zur Aktivierung von AKT (Kamalati et al., 2000, Zhang et al., 2005) und sensibilisiert die Zellen für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Kamalati et al., 1996). EGF wiederum aktiviert PTK-6 (Kamalati et al., 2000, Chen et al., 2004) und beeinflusst die Apoptose (Haegebarth et al., 2005). Aubele et al. zeigten in ihrer Studie eine signifikante Korrelation zwischen der PTK-6 und der HER-2 Expression auf Proteinebene und bestätigten damit die Resultate der 2005 durchgeführten mRNA Studie (Aubele et al., 2007, Born et al., 2005). PTK-6 korreliert außerdem stark mit der Expression von HER-3 und HER-4, was darauf hinweist, dass sie eine wichtige Rolle im Signalnetzwerk der HER-Familie spielt (Aubele et al., 2007).

## 2 ZIELSETZUNG

Es ist bekannt, dass die Gene HER-2/neu und GRB-7 auf DNA-Ebene, sowie auf mRNA- und Protein-Ebene miteinander korrelieren (Kauraniemi et al., 2001 und 2003, Luoh, 2002).

Ebenfalls wurden Studien veröffentlicht, die zeigten, dass PTK-6 mit HER-2 auf den beschriebenen Ebenen korreliert (Aubele et al., 2007, Born et al., 2005).

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Gene HER-2, GRB-7 und PTK-6 sowie die entsprechenden Zentromere der Chromosomen mittels FISH-Technik darzustellen und auf eine Amplifikation oder Polysomie hin zu untersuchen. Die gewonnenen Werte sollten dann hinsichtlich einer möglichen Korrelationen mit Daten von früheren Studien (Immunhistochemie, mRNA (Taqman Q-PCR)- Analyse) sowie mit vorliegenden klinischen und histopathologischen Parametern und Verlaufsdaten von mehr als 20 Jahren untersucht werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Gewebe und Patientenkohorte

Es wurde Gewebe von 150 formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten invasiven Mammakarzinomen (ausschließlich Primärtumore) untersucht. Wie unten beschrieben wurden Gewebe-Arrays hergestellt, die jeweils rund 50 Tumorgewebe beinhalteten (C1, C2, Array2). Auf den Gewebe-Arrays C1 und C2 befanden sich Gewebestanden aus randomisiert ausgesuchten Fällen vom Karolinska Institut, Stockholm, Schweden. Von diesen insgesamt 95 Patientinnen waren klinische Verlaufsdaten von mehr als 20 Jahren verfügbar (siehe Anhang 1). Array 2 beinhaltete 50 Fälle aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des Klinikums Rechts der Isar. Es handelte sich um neuere Fälle, weshalb noch keine Verlaufsdaten vorlagen. Die klinische und histopathologische Klassifizierung aller untersuchten Tumore ist in Anhang 1 aufgelistet.

Methodische Untersuchungen wurden an den Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und MCF7 durchgeführt, die Laborbestand des Instituts für Pathologie des Helmholtz Zentrums München (ehemals GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) in Neuherberg sind. Als Kontrolle für die Gewebe-Arrays wurde histologisch unauffälliges Kolon- und Nierengewebe verwendet.

#### 3.1.2 FISH – Sonden

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurden folgende DNA- Sonden verwendet: Die HER-2/neu/CEP 17 Sonde der Firma Vysis (Vysis, Inc., Downers Grove, Illinois), die GRB-7 Sonde und die Zentromer 20 Sonde der Firma Chrombios (Molecular Cytogenetics Chrombios, Raubling) sowie eine Gensonde bestehend aus PAC-(P1 derived artificial chromosome) Klon (RP4-697K14) und zwei BAC-(Bacterial Artificial Chromosome) Klonen (RP11-1021015 und RP11-740M04), welche die DNA Sequenz des PTK-6-Gens abdecken. Die HER-2/neu/CEP17 Sonde markiert das Zentromer 17 mit einem grünen (SpectrumGreen) und das HER-2/neu Gen mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (SpectrumOrange). Die GRB-7 Sonde (Chrombios No. 170 + 171, Clone IDs CTD-3079B24 und RP11-387H17) trägt einen roten Fluoreszenzmarker (SpectrumOrange). Die BAC-Klone und der PAC-Klon, die

spezifisch für das PTK-6-Gen sind, sind ebenfalls in roter Fluoreszenz (Cy 3), die Zentromer 20 Sonde (FITC) ist in grüner Fluoreszenz markiert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung der Tissue Mikroarrays

Die Erstellung der Tissue Mikroarrays erfolgt nach Standardmethoden am Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums (Richter et al, 2000). Um repräsentative Tumorregionen zu identifizieren wurde jeweils ein mit Hämatoxilin und Eosin (H+E) gefärbter Schnitt der Paraffin Blöcke benutzt. Anschließend wurden aus den korrespondierenden Blöcken Gewebezylinder von 0,6mm Durchmesser ausgestanzt und mit Hilfe eines „Tissue arrayer“ Instruments (Beecher Instruments, USA) in einen Empfängerblock eingesetzt. Aus den daraus entstehenden 'Tissue Mikroarrays'- (TMA) Blöcken wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hilfe des „paraffin-tape-transfer-system“ (Instrumedics, Hackensack, NJ) auf einen adhäsiven Objektträger aufgebracht. Um die ausgestanzten Proben als repräsentativ zu validieren wurde von den TMA ebenfalls jeweils ein Schnitt H+E gefärbt und auf repräsentatives Tumorgewebe hin beurteilt.

### 3.2.2 Fluoreszenz in situ Hybrdisierung

#### 3.2.2.1 Verwendete Reagenzien

- Citratpuffer: 18ml Lsg. A + 82ml Lsg. B ad 1000ml Aqua dest., pH 6,0
  - Lsg. A: 0,1M Zitronensäure (Merck, Darmstadt) (= 21,01g  $C_6H_8O_7$  x  $H_2O$  in 1000ml A. dest.)
  - Lsg. B: 0,1M Natriumcitrat (Merck, Darmstadt) (= 19,41g  $C_6H_8Na_3$  x 2  $H_2O$  in 1000ml A. dest.)
- Pronase E: (aus *Streptomyces griseus*) (Merck, Darmstadt)
  - 0,05% (50mg Pronase in 100ml 1x Phosphate Buffered Saline (PBS))
- 50% Formamid/2x Standard Sodium Citrat (SSC): 50ml Formamid + 10ml 20x SSC + 40ml A.dest.
- 70% Formamid/2x SSC: 70ml Formamid + 10ml 20x SSC + 20ml A.dest., pH 7,5
- Nonidet P40 (NP 40)
- Hoechst 33342

- HER-2/neu/CEP 17 Sonde: Sonde der Firma Vysis (Vysis, Inc., Downers Grove, Illinois)
- GRB-7 – Sonde: Sonde No 170, Clone ID: CTD- 3079B24 der Firma Chrombios (Molecular Cytogenetics Chrombios, Raubling, Deutschland)
- Zentromer 20 – Sonde: Kontrollklon 20q11 der Firma Chrombios (Molecular Cytogenetics Chrombios, Raubling, Deutschland)
- PTK-6-Sonde (Chrombios, Raubling), Cy3/orange markiert
- Vectashield: Monitoring Medium for Fluorescence H 1000, Fa. Linaris, Biol. Produkte, 97877 Wertheim

### 3.2.2.2 Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, welches ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen, z.B. die eines bestimmten Gens, direkt am biologischen Präparat zu lokalisieren und nachzuweisen. Die DNAs von „Sonde“ und „Ziel“ müssen dafür denaturiert, also einzelsträngig vorliegen. Dann wird eine zur Zielsequenz komplementäre fluoreszenzmarkierte Nukleotidsequenz (die DNA-Sonde) mit der Zielsequenz hybridisiert. Durch die Fluoreszenzmarkierung kann nun das Vorliegen der Zielsequenz in den Zellen des Tumorgewebes nachgewiesen werden. Bei Bedarf kann auch eine Doppelmarkierung wie im Falle der HER-2/neu - Zentromer 17 Probe durchgeführt werden, die gleichzeitig Zentromer und Gen in unterschiedlichen Fluoreszenzfarben markiert.

Mit Laser-Scanning-Mikroskopen, wie z.B. dem Apotome, werden dann von dem hybridisierten Schnitt optische Schnittbilder aufgenommen, an denen anschließend die Fluoreszenzsignale ausgewertet werden können.

Die Tissue Micro Arrays mit dem Gewebe lagen bereits im Institut vor, die Präparation der histologischen Schnitte für die FISH mit der HER-2/neu-, der GRB-7- und der PTK-6-Sonde wurde nach einem im Institut etablierten Protokoll durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.1.).

### 3.2.3 Apotome

Für die Aufnahme der Bilder wurde das mit einer Apotome Extension (Zeiss Vision, Jena) ausgestattete Epifluoreszenz Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Standardtechnik in der modernen biomedizinischen Forschung. Bei relativ dicken zu untersuchenden Objekten kann es folgende Probleme mit der

Schärfe der Bilder geben: Die scharf gestellte Ebene kann von verschwommenen Informationen der nicht fokussierten Ebenen überlagert werden, was zu einem unscharfen Bild führt. Das Apotome fertigt „optische Schnitte“ durch das Objekt an, wodurch dieses Problem gelöst wird. Das angewandte Prinzip wird in der Literatur „Gitterprojektion“ oder auch „strukturierte Beleuchtung“ genannt. Eine Gitterstruktur mit definierter Gitterkonstante wird in die Fokusebene des Objektivs projiziert und in drei definierten Schritten lateral in der Probe bewegt. Eine CCD Kamera nimmt an jeder Position des Gitters ein Bild auf. Aus diesen drei Rohbildern wird online ein Ergebnisbild errechnet. Das Resultat ist ein optischer Schnitt durch die Probe. Die aus den Präparatebenen ober- und unterhalb der Fokusebenen stammenden Bildanteile werden dabei ausgeblendet. Dadurch entsteht ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, sowie eine um ca. Faktor 2 verbesserte Auflösung in axialer (Z) Richtung.

(Quelle: <http://www.zeiss.de>)

#### 3.2.3.1 **Bildverarbeitung**

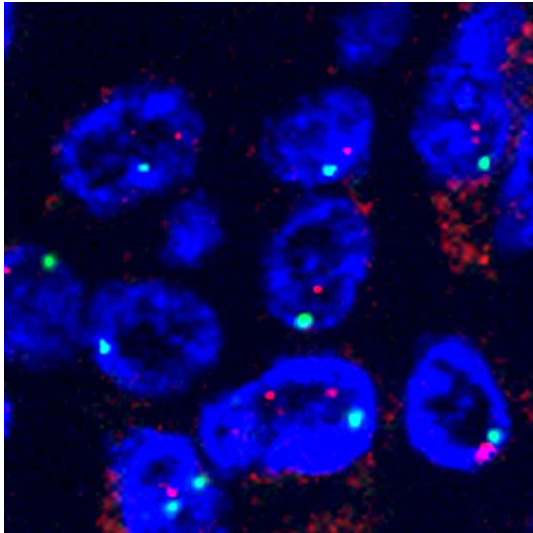
Von jedem Tumorgewebe wurden pro Hybridisierungssonde die FISH-Signale von > 50 Tumorzellen ausgewertet. Dies entsprach, je nach Gewebedichte, zwischen drei und fünf Blickfeldern pro Fall. Im Durchschnitt wurden pro Blickfeld fünf optische Schnitte im Abstand von 0,5µm aufgenommen. Diese optischen Schnitte konnten als Z-Stapel oder auch als Projektion gespeichert werden (Beispiele siehe Abbildungen 1-4). Mit Hilfe des Programms AxioVert (Zeiss) wurden am Computer die Signale gezählt und in Excel-Tabellen eingetragen.

### 3.2.3.2 Auszählung Signale

#### 3.2.3.2.1 HER-2/neu – Sonde

Die HER-2/neu Sonde markiert gleichzeitig das Zentromer 17 (grüne Fluoreszenz) und das auf Chromosom 17 lokalisierte HER-2/neu Gen (rote Fluoreszenz). Fluoreszenzdaten wurden in Excel importiert und die mittlere Signalfrequenz pro Tumor sowie das Verhältnis roter zu grüner Signale (HER-2/neu zu Zentromer) berechnet. In normalen Zellen beträgt die mittlere Signalfrequenz 2 pro Zellkern, im histologischen Schnitt wird von einer mittleren Signalfrequenz zwischen 1,5 und 1,8 ausgegangen, was durch angeschnittene Zellkerne bei 5µm dicken Schnitten bedingt ist. In den vorliegenden Untersuchungen wurde von einer mittleren Signalfrequenz von 1,7 ausgegangen, ein Wert, der anhand der mituntersuchten unauffälligen Gewebeproben erhoben wurde. Statistisch wurde deshalb ein Wert von  $>1,7$  Signale / Zellkern als erhöhte Signalfrequenz betrachtet. HER-2/neu Signale  $>1,7$ /Zellkern, weisen in Abhängigkeit von den Zentromersignalen auf eine Genamplifikation (Zentromersignale normal  $\leq 1,7$ ) bzw. auf eine Polysomie des Chromosom 17 hin (Zentromersignale ebenfalls erhöht  $\geq 1,7$ ). Bei normalem genetischen Status sowie bei einer Polysomie 17 liegt das Verhältnis der Signale rot zu grün bei 1. Ein rot zu grün Verhältnis von  $>1$  beschreibt dagegen eine HER-2/neu Amplifikation.

**Abbildungen 1 A-B:** FISH mit der HER-2/neu Sonde in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen. Grüne Signale = Zentromersonde; rote Signale = Sonde für das Gen HER-2/neu

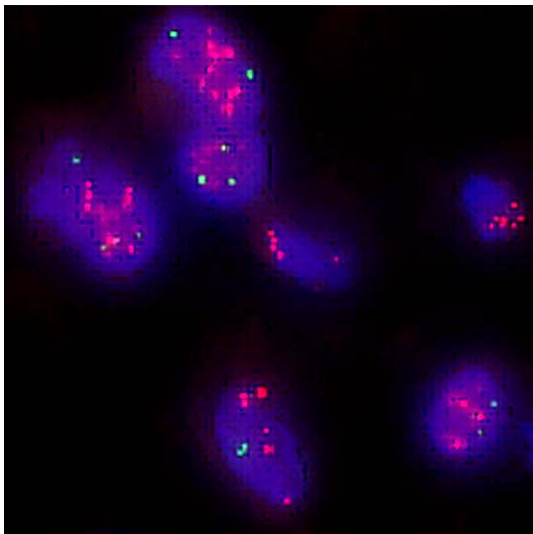


**Abbildung 1a:**

Mamma-Drüsenepithel.

Bei gesundem Mammagewebe sollten jeweils zwei Signale pro Zellkern zu erkennen sein. Im histologischen Schnitt, bedingt durch einige angeschnittene Zellkerne bei 5 µm dicken Schnitten, liegt die Anzahl der Signale im Durchschnitt zwischen 1,5 und 1,8.

Wenn mehr als zwei grüne Signale pro Zellkern zu erkennen sind, spricht dies für eine Polysomie wenn das Verhältnis rot:grün = 1 ist. Eine Genamplifikation liegt vor, wenn das rot:grün Verhältnis >1 ist.



**Abbildung 1b:**

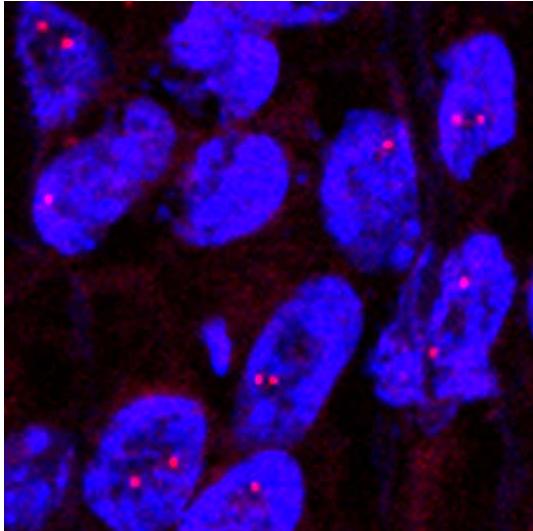
Der Fall H2-a2 zeigt eine HER-2 Amplifikation.



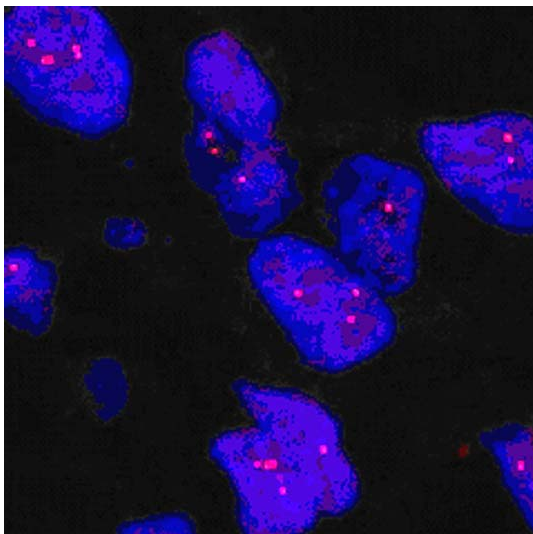
#### 3.2.3.2.2 GRB-7 Sonde

Die GRB-7 Sonde markiert das GRB-7 Gen mit roter Fluoreszenz. Auch hier wurden ungefähr 50 Tumorzellkerne ausgewertet. Da das GRB-7 Gen ebenfalls auf Chromosom 17 liegt, wurden die Signalhäufigkeiten des Zentromer 17 übernommen. Analog zum oben Beschriebenen beträgt in normalen Zellen aufgrund des Anschnittes die mittlere Signalfrequenz 1,7 pro Zellkern. Auch hier weist eine erhöhte Signalfrequenz der GRB-7-Sonde ( $>1,7/\text{Zellkern}$ ) in Abhängigkeit von den Zentromersignalen auf eine Genamplifikation hin (Zentromersignale normal) bzw. auf eine Polysomie des Chromosom 17 (Zentromersignale ebenfalls erhöht).

**Abbildungen 2 A-B:** FISH mit der GRB-7 Sonde in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen. Rote Signale = Sonde für das Gen GRB-7



**Abbildung 2a:**  
Mamma-Drüsengewebe mit jeweils 1 bzw. 2 Signalen pro Zellkern. (s.Text Abb. 1a)



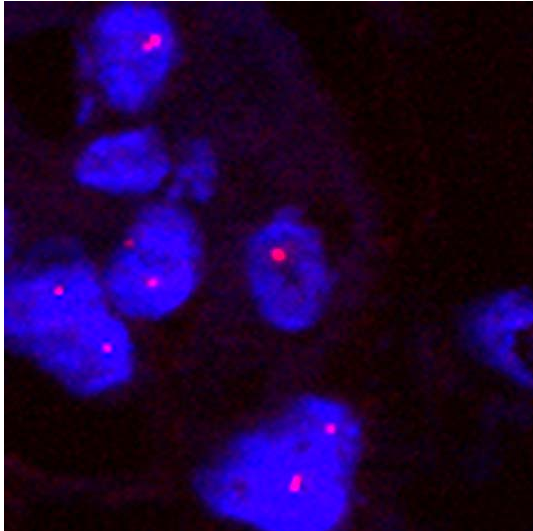
**Abbildung 2b:**  
Der Fall H2-a2 zeigt vermehrt GRB-7 Signale bei normal vorliegenden Zentromersignalen; es handelt sich also um eine GRB-7 Amplifikation.

### 3.2.3.2.3 Sonden für das PTK-6-Gen und Zentromer 20

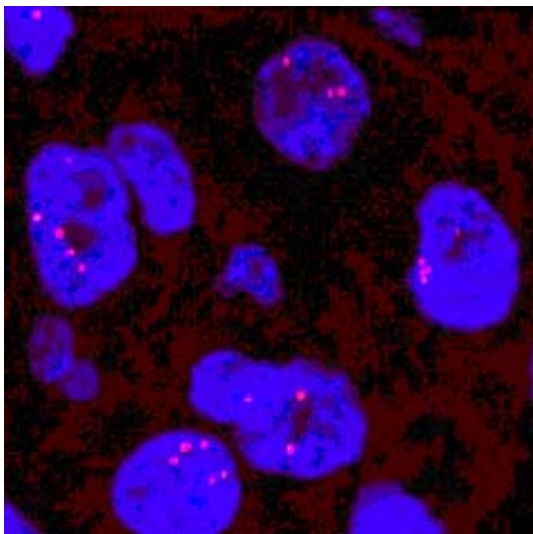
Die BAC-Klone und der PAC-Klon markieren das PTK-6-Gen mit Cy3 (rote Fluoreszenz), die Zentromer 20 Sonde markiert das Zentromer 20 mit FITC (grüne Fluoreszenz). Analog zu den beiden vorherigen Sonden wurden Signale von ungefähr 50 Kernen pro Tumor ausgewertet. Dabei wurden die roten, genspezifischen Signale einzeln, die grünen zentromerspezifischen Signale hingegen am Mikroskop ausgezählt und dann als normal ( $\leq 2/\text{Kern}$ ) oder als polysom ( $>2/\text{Kern}$ ) eingestuft. Auch hier beträgt durch den Zell-Anschnitt die mittlere Signalfrequenz in normalen Zellen  $\leq 1,7$  pro Zellkern.

Das Verhältnis wurde in diesem Fall in Abhängigkeit von der Zentromerfrequenz bestimmt:  $>1,7$  PTK-6-Signale/Zellkern und Zentromersignale ebenfalls erhöht spricht für eine Polysomie 20,  $>1,7$  PTK-6-Signale/Zellkern und Zentromersignale normal spricht für eine PTK-6-Genamplifikation.

**Abbildungen 3 A-B:** FISH mit dem PTK-6 PAC-Klon (rote Fluoreszenzsignale) in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen

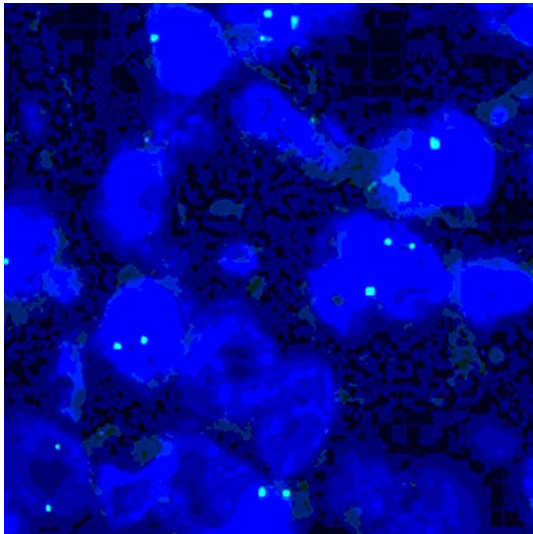


**Abbildung 3a:**  
Mamma-Drüsengewebe mit jeweils 1 bzw. 2 Signalen pro Zellkern. (s.Text Abb. 1a )

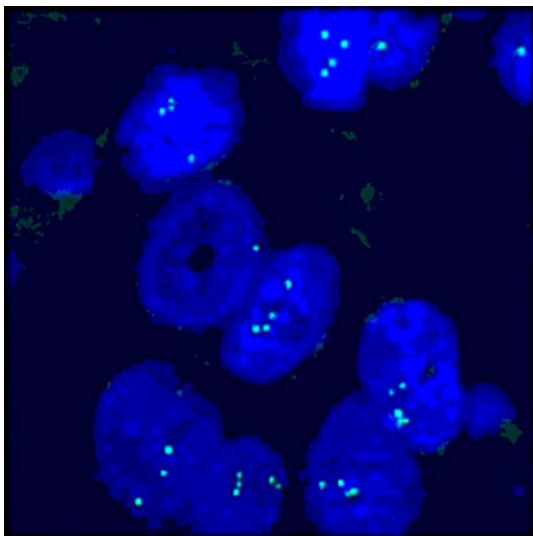


**Abbildung 3b:**  
Der Fall Nr. 11896 zeigt vermehrt PTK-6-Signale. Da die Signale für Zentromer 20 normalverteilt vorliegen (siehe Abb. 4a), handelt es sich um eine PTK- Amplifikation.

**Abbildungen 4 A-B:** FISH mit dem Zentromer 20 Marker (grüne Fluoreszenzsignale) in histologischen Schnitten von Mammakarzinomen



**Abbildung 4a:**  
Der Fall Nr. 11896 zeigt eine normale Signalfrequenz von Zentromer 20 in den Tumorzellkernen.



**Abbildung 4b:**  
Der Fall Nr. 2172 zeigt eine Polysomie von Chromosom 20 in den Tumorzellkernen.

### 3.2.4 Statistik

#### 3.2.4.1 p-Werte

In dieser Arbeit wurden generell p-Werte  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. Für die multivariate Überlebensanalyse wurden alle Parameter zugelassen, die in univariater Analyse (Kaplan Meier Analyse) einen Signifikanzwert von mindestens  $p \leq 0,15$  erreichten.

#### 3.2.4.2 Spearmannscher Rangkorrelationskoeffizient

Sind die zu prüfenden Variablen nicht normal verteilt, kann mit diesem Test der Korrelationskoeffizient berechnet werden. Die Messwerte werden ihrer Größe nach in eine Rangfolge gebracht, so dass jeder Messwert einen bestimmten Rangplatz erhält. Aus diesen Rangwerten wird der Korrelationskoeffizient berechnet, welcher Werte zwischen +1 und -1 annehmen kann. Der Betrag des Korrelationskoeffizienten gibt an, wie eng die Beziehung zwischen den beiden Variablen ist. Bei Werten von  $\pm > 0,7$  spricht man von guter Korrelation, bei Werten von  $\pm 0,7-0,4$  von moderater Korrelation. Dieser Test wurde verwendet, um herauszufinden, ob einzelne Gene miteinander oder mit weiteren Zellmerkmalen oder klinisch- histopathologischen Merkmalen korreliert sind.

#### 3.2.4.3 Kaplan-Meier Methode

Die Kaplan Meier Methode wird bei Überlebenszeitanalysen angewandt, bei denen nicht alle Individuen der gesamten Testdauer ausgesetzt sind. Bei dieser Methode sind die Beobachtungsintervalle nicht fest vorgegeben, sondern werden durch die Ergebnisse definiert. Ein neues Zeitintervall wird dadurch vorgegeben, dass ein Patient verstirbt. Für jedes Zeitintervall wird die bedingte Wahrscheinlichkeit berechnet, dass Patienten das Zeitintervall überleben, falls sie schon bis zum Beginn des neuen Zeitintervalls überlebt haben. Die Gesamtwahrscheinlichkeit dafür, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben, lässt sich dann als Produkt der entsprechenden bedingten Wahrscheinlichkeiten darstellen (Ziegler et al., 2007). Mit der Kaplan-Meier Methode wurde die univariate Korrelation der einzelnen Parameter mit dem fernmetastatenfreien Überleben der Patientinnen berechnet.

#### 3.2.4.4 Log-Rang- $\chi^2$ -Test

Der Log-Rang Test ist eine der populärsten Methoden, um in der medizinischen Statistik die Überlebenswahrscheinlichkeiten zweier oder mehrerer Gruppen zu vergleichen. Es wird von der Nullhypothese ausgegangen, die besagt, dass kein Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der Gruppen besteht. Die Summe der erwarteten Ereignisse wird errechnet und dann mathematisch mit der Summe der beobachteten Ereignisse verglichen. Um die Nullhypothese zu testen, wird nun der Log-Rang- $\chi^2$  Test verwendet, (Bland et al., 2004). In dieser Arbeit wurde der Log-Rang-Test verwendet um Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier Kurven in Abhängigkeit von den verschiedenen Gruppen zu testen.

#### 3.2.4.5 Multivariate Analysen mit Cox „proportional hazards“ Regression

Mit multivariaten Verfahren wird das Zusammenwirken mehrerer Variablen auf eine abhängige Variable und ihre Abhängigkeitsstruktur untersucht. Hier wurde das Zusammenwirken der Genamplifikationen und der klinisch-histopathologischen Parameter auf das Auftreten von Fernmetastasen untersucht um herauszufinden, welche der Parameter gemeinsam die Überlebensvorhersage optimieren.

Die Cox-Regression ist eine der meist genutzten Methoden zur multivariaten Analyse von Überlebensdaten in der medizinischen Statistik. Sie wird zur Schätzung des gleichzeitigen Effekts mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable eingesetzt. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs zwischen der Zielvariablen und den Einflussgrößen können für jede Einzelvariable Hazard Ratios berechnet werden, durch die das relative Risiko pro Skaleneinheit in Hinblick auf ein interessierendes Ereignis (hier das Auftreten von Fernmetastasen) geschätzt werden kann. Wenn sich der Wert einer Einzelvariablen um die Differenz von 1,0 ändert, ändert sich das Risiko um den Betrag des Hazard Ratios.

Die Hazard Ratios wurden mit einem Chi-Quadrat-Test (Wald) auf Signifikanz getestet.

Die multivariaten Analysen wurden mit dem Daten-Analyse-System R (packages ‚stats‘ und ‚survival‘, <http://www.r-project.org>) durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

Die FISH-Analysen wurden für die drei Gene HER-2/neu, GRB-7 und PTK-6 durchgeführt. Pro Gen lagen je 3 Tissue Mikroarrays mit jeweils ca. 50 Tumorgewebeproben vor (Array2 mit 45 bzw. 46 Gewebe-Spots, C1 mit 51 Spots, C2 mit 50 Spots).

### 4.1 Signalhäufigkeiten

In Tabellen 1 und 2 sind die Signalhäufigkeiten der verschiedenen Gene zusammengefasst. Bei den Arrays, die mit HER-2- und GRB-7-Sonde markiert waren, wurde die Ratio Gen zu Zentromer 17 (#17) berechnet, d.h. alle leicht und moderat erhöhten Werte deuten auf eine Amplifikation hin. Insgesamt wurden für beide Gene jeweils 146 Fälle untersucht. Bei HER-2 waren davon insgesamt 23 Fälle nicht auswertbar, bei GRB-7 war dies in 26 Fällen der Fall, meist, weil das Gewebe durch die strenge Vorbehandlung zerstört war. Bei HER-2 lag in insgesamt 54 Fällen eine Amplifikation vor, in 39 Fällen eine leichte (mit  $\text{Ratio Gen}/\#17 > 1 \leq 1,5$ ) und in 15 Fällen eine moderate (mit  $\text{Ratio Gen}/\#17 > 1,5$ ). 69 Fälle wiesen keine Amplifikation auf. GRB-7 war in insgesamt 86 Fällen amplifiziert, davon in 58 Fällen leicht und in 28 Fällen moderat. In 34 Fällen war das Gen nicht amplifiziert (Tab.1).

**Tabelle 1: Signalhäufigkeit für die Gene Her-2 und GRB-7**

	Normal: Ratio Gen/#17 $\leq 1$	Leicht erhöht: $> 1 \leq 1,5$	Moderat erhöht: $> 1,5$	Nicht auswertbar
<b>HER-2</b>				
Array2	28	11	1	5
C1	23	11	7	10
C2	18	17	7	8
<b>Insg.</b>	<b>69</b>	<b>39</b>	<b>15</b>	<b>23</b>
<b>GRB-7</b>				
Array2	17	17	5	6
C1	9	20	10	12
C2	8	21	13	8
<b>Insg</b>	<b>34</b>	<b>58</b>	<b>28</b>	<b>26</b>

Da bei PTK-6 die Zentromer 20 (#20) Signale nicht ausgezählt, sondern lediglich am Computer als „Normal“ oder „Polysomie“ klassifiziert wurden, konnte in diesem Fall keine Gen zu Zentromer Ratio errechnet werden. Es wurden auf allen 3 Arrays insgesamt 147 Fälle untersucht, wovon 115 ausgewertet werden konnten. Insgesamt 44 Fälle wiesen eine PTK-6 Amplifikation auf, davon 31 Fälle eine leichte Amplifikation (mit 1,7-2 Signalen/Kern) und 13 Fälle eine moderate Amplifikation (mit  $> 2$  Signalen/Kern). Fünfzehn Fälle wurden als



polysom bewertet, 56 Fälle wiesen weder eine Amplifikation noch eine Polysomie auf (Tab. 2)

**Tabelle 2: Signalhäufigkeiten für PTK-6**

	Normal (< 1,7 Signale/Zellkern)	Leicht erhöht (1,7 - 2)	Moderat erhöht (> 2)	Polysomie	Nicht auswertbar
<b>PTK-6</b>					
Array2	24	10	0	7	5
C1	7	12	9	3	20
C2	25	9	4	5	7
<b>Insg</b>	<b>56</b>	<b>31</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>32</b>

## 4.2 Korrelation der Zellparameter untereinander

### 4.2.1 Korrelationen der untersuchten FISH-Parameter untereinander

Die Ergebnisse der FISH wurden statistisch auf Korrelation untereinander untersucht. Wie in Tabelle 3 zusammengestellt, korrelieren die Signalhäufigkeiten von HER-2 und GRB-7, HER-2/#17 und GRB-7/#17, HER-2 und PTK-6, GRB-7 und PTK-6. Außerdem zeigen PTK-6/#20 und Z. 17 eine signifikante Korrelation zueinander. Eine HER-2 Amplifikation korreliert also mit einer GRB-7-Amplifikation, während keine Korrelation zwischen HER-2 Amplifikation und PTK-6 Amplifikation vorlag. Die Korrelation PTK-6 mit HER-2 Signalen basiert auf einer Polysomie 20, da das Ratio PTK-6/#20 nicht signifikant assoziiert ist. Eine PTK-6-Amplifikation korrelierte ausschließlich mit einer Zentromer 17 Polysomie.

Ein p-Wert von  $\leq 0.05$  wurde als signifikant betrachtet.

**Tabelle 3: Korrelationen (p-Werte) der FISH-Ergebnisse aus 150 invasiven Mammakarzinomen**

<b>FISH vs. FISH</b>	HER-2	#17	HER-2/#17	GRB-7	GRB-7 /#17
HER-2		<b>&lt; 0,0001</b>		<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0014</b>
#17	<b>&lt; 0,0001</b>			<b>&lt; 0,0001</b>	
HER-2/#17				<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
PTK-6	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,16	<b>0,00056</b>	0,27
PTK-6/#20	0,096	<b>0,00066</b>	0,55	0,16	0,64

## 4.2.2 Korrelation der FISH-Parameter mit weiteren vorhandenen Zellmerkmalen

### 4.2.2.1 Korrelation der FISH-Parameter mit der mRNA

Die FISH- Ergebnisse wurden statistisch auf Korrelation mit im Institut bereits vorliegenden Ergebnissen der mRNA Expression untersucht. Tabelle 4 zeigt eine Korrelation zwischen GRB-7 und HER-2, sowie #17 und HER-2/#17 und zwischen HER-2 und GRB-7 sowie GRB-7 /#17. Das bedeutet, dass die auf mRNA-Ebene vorliegende Überexpression von GRB-7 mit einer DNA-Amplifikation von HER-2 korreliert sowie eine HER-2 mRNA-Überexpression mit einer GRB-7-Amplifikation korreliert. Ein p-Wert von  $\leq 0.05$  wurde als signifikant betrachtet.

**Tabelle 4: Korrelationen (p-Werte) der FISH-Ergebnisse aus 150 invasiven Mammakarzinomen mit mRNA-Ergebnissen**

<b>FISH vs. mRNA</b>	<b>HER-2-mRNA</b>	<b>GRB-7-mRNA</b>	<b>PTK-6-mRNA</b>
HER-2	<b>0,022</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,13
#17	0,90	<b>0,031</b>	0,21
HER-2/#17	<b>0,0017</b>	<b>0,00020</b>	0,083
GRB-7	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,00027</b>	0,59
GRB-7 /#17	<b>0,00012</b>	<b>0,0082</b>	0,33
PTK-6	0,89	0,064	<b>0,0056</b>
PTK-6/#20	0,56	0,058	0,069

### 4.2.2.2 Korrelation der FISH-Parameter mit der Immunhistochemie

Die FISH- Ergebnisse wurden statistisch auf Korrelation mit im Institut bereits vorliegenden Ergebnissen der Immunhistochemie untersucht. Wie in Tabelle 5 zusammengestellt, zeigt HER-2-IHC eine signifikante Korrelation mit den FISH Parametern HER-2, HER-2/#17, GRB-7 und GRB-7 /#17. HER-4-IHC korreliert signifikant mit #17, und PTK-6-IHC zeigt eine signifikante Korrelation mit #17 und GRB-7 /#17 (Tab. 5). Die Immunhistochemie von HER-2 korreliert also signifikant mit einer HER-2- und einer GRB-7-DNA-Amplifikation, und PTK-6-IHC korreliert signifikant mit einer GRB-7-DNA-Amplifikation.

**Tabelle 5: Korrelationen (p-Werte) der FISH-Ergebnisse aus ca. 150 invasiven Mamma-  
karzinomen mit den Ergebnissen der Immunhistochemie**

<b>FISH vs. IHC</b>	HER-1- IHC	HER-2- IHC	GRB-7- IHC	HER-3- IHC	HER-4- IHC	PTK-6- IHC
HER-2	0,49	<b>0,00049</b>	0,25	0,77	0,38	0,99
#17	0,63	0,78	0,26	0,84	<b>0,05 -</b>	<b>0,035 -</b>
HER-2/#17	0,75	<b>0,00027</b>	0,844	0,65	0,10	0,068
GRB-7	0,75	<b>&lt; 0,0001</b>	0,36	0,29	0,76	0,43
GRB-7 /#17	0,65	<b>&lt; 0,0001</b>	0,92	0,38	0,12	<b>0,015</b>
PTK-6	0,50	0,39	0,91	0,51	0,11	0,93
PTK-6/#20	0,83	0,85	0,89	0,60	0,93	0,10

#### 4.3 Korrelation der FISH-Parameter mit klinisch-histopathologischen Merkmalen

Die FISH-Ergebnisse wurden mit den klinischen und histopathologischen Parametern (Grading, Histologie, Lymphknotenstatus (LK Status), Größe des Tumors, Estrogen- (ER) und Progesteronrezeptorstatus (PrR)) statistisch ausgewertet. Wie in Tabelle 6 zusammengestellt, bestand eine signifikante Korrelation zwischen HER-2- und GRB-7-FISH-Signalen und dem histologischen Grad nach Elston und Ellis. Außerdem besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen der Tumorgöße und den Zentromer 17-FISH-Signalen, den HER-2- und den PTK-6-Signalen. Da in beiden Fällen keine Korrelation zum entsprechenden Ratio bestand, beruht auch diese Korrelation auf einer Polysomie, nicht auf einer Genamplifikation (Tab. 6).

**Tabelle 6: Korrelationen (p-Werte) der FISH-Ergebnisse aus 150 invasiven Mammakarzinomen mit den klinisch-histologischen Parametern**

<b>FISH vs. Klin. &amp; Hist. Param.</b>	Histologisches Grading	Histologie	LK Status	Tumorgröße	ER	PrR
HER-2	0,088	0,71	0,58	<b>0,026</b>	0,91	0,73
#17	0,80	0,17	0,12	<b>0,0048</b>	0,98	0,51
HER-2/#17	<b>0,032</b>	0,34	0,15	0,76	0,75	0,34
GRB-7	0,14	0,59	0,71	0,24	0,52	0,47
GRB-7 /#17	<b>0,029</b>	0,69	0,10	0,60	0,27	0,35
PTK-6	0,44	0,55	0,97	<b>0,029</b>	0,54	0,84
PTK-6/#20	0,25	0,84	0,14	0,084	0,92	0,36

#### 4.4 Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen

##### 4.4.1 Univariate Analyse

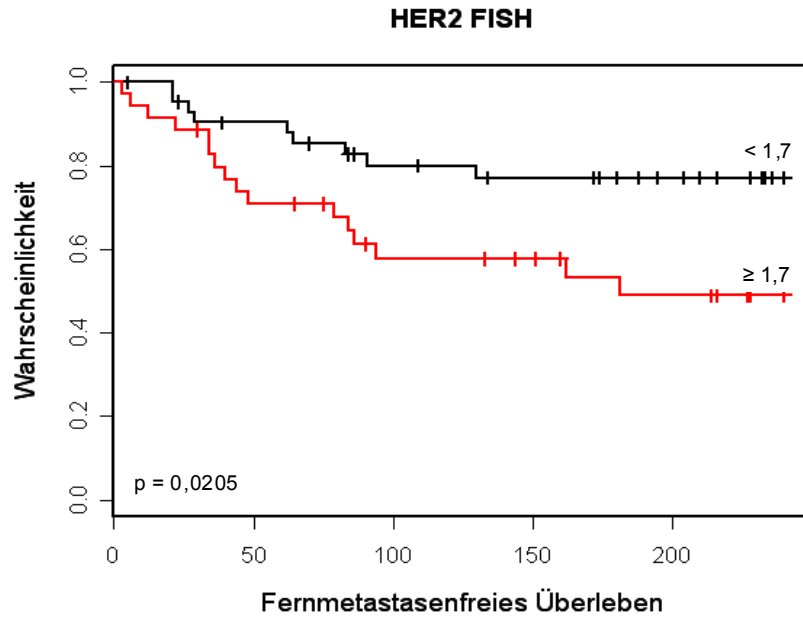
Für diese Untersuchung lagen am Institut bereits Verlaufsdaten vor. Die Überlebenskurven wurden nach der Kaplan Meier-Methode erstellt (Kaplan et al., 1958). Mittels Log-Rang-Test wurden Berechnungen zur Prüfung der statistischen Signifikanz von Unterschieden der gewonnenen Überlebenskurven durchgeführt. P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Zur kategorisierten Analyse der unterschiedlichen Gen-Expressionen wurden die in die Studie eingeschlossenen Patienten in jeweils zwei Gruppen unterteilt. Die FISH-Ergebnisse sowie die anderen bereits im Institut vorliegenden Ergebnisse von der Immunhistochemie, der mRNA-Analyse und den klinisch-histopathologischen Parametern wurden nun jeweils hinsichtlich einer Korrelation mit dem metastasenfreien Überleben von 240 Monaten untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine erhöhte HER-2 Signalfrequenz (Abb.5), eine #17 Polysomie (Abb.6) und eine GRB-7-Amplifikation (Abb.7) einen negativen Einfluss auf das metastasenfreie Überleben haben.

Die vorliegenden Daten der Immunhistochemie und die klinisch-histopathologischen Parameter wurden auf gleiche Weise auf ihre Relevanz für das Auftreten von Fernmetastasen untersucht. Von den klinisch-histopathologischen Parametern korrelieren die Tumorgröße (Abb.9) und der Lymphknotenstatus (Abb.8) positiv mit dem Auftreten von Fernmetastasen. Auf Proteinebene (IHC) zeigte sich, dass HER-4 (Abb.10), GRB-7 (Abb.12) und PTK-6 (Abb.11) signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen korrelieren, wobei HER-4 und PTK-6 invers korrelieren und demnach eine protektive Wirkung zu haben scheinen. GRB-7

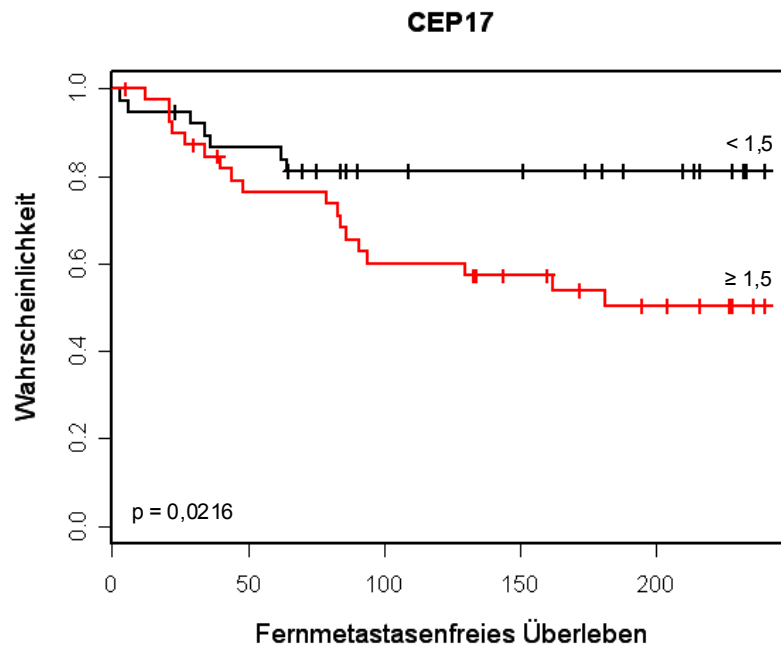
ist positiv korreliert, daher ist bei einer Überexpression die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Fernmetastasen signifikant erhöht.

**Tabelle 7: Univariate Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen (nur statistisch signifikante Werte aufgelistet)**

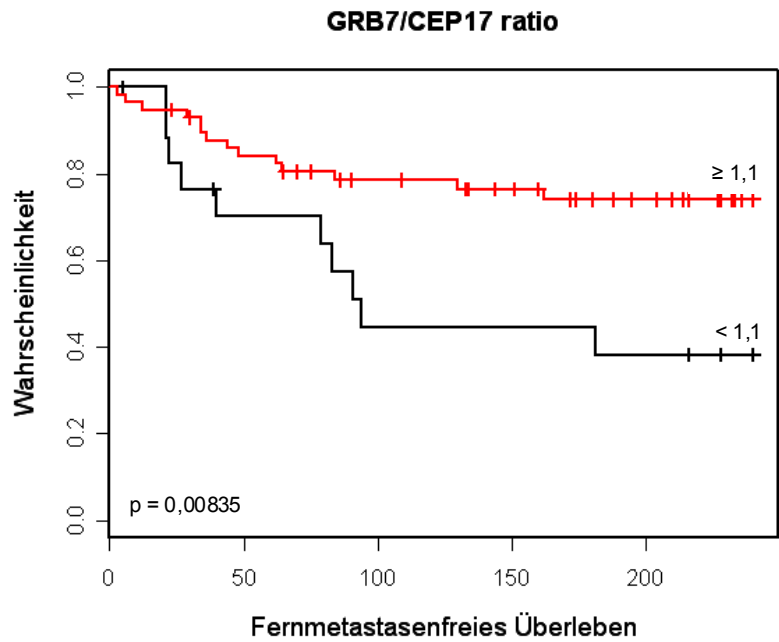
<b>Parameter und Gruppierung</b>	<b>p-Wert</b>
HER-2 Signale Gruppe 0 = <1,7 Signale/Kern Gruppe 1 = ≥1,7	0,0205
#17-Signale Gruppe 0 = <,5 Signale/Kern Gruppe 1 = ≥1,5	0,0216
Ratio GRB-7 /#17 Gruppe 0 = <1,1 Signale/Kern Gruppe 1 = ≥1,1	0,00835
Lymphknotenstatus Gruppe 0 = negativ Gruppe 1 = positiv	0,0234
Tumorgröße Gruppe 0 = ≤2 cm Gruppe 1 = >2 cm	0,0412
IHC HER-4 Gruppe 1 = 0/1+ Gruppe 2 = 2+/3+	0,034, invers
IHC PTK-6 Gruppe 1 = 0/1+ Gruppe 2 = 2+/3+	0,00691, invers
IHC GRB-7 Gruppe 1 = 0/1+ Gruppe 2 = 2+/3+	0,0482



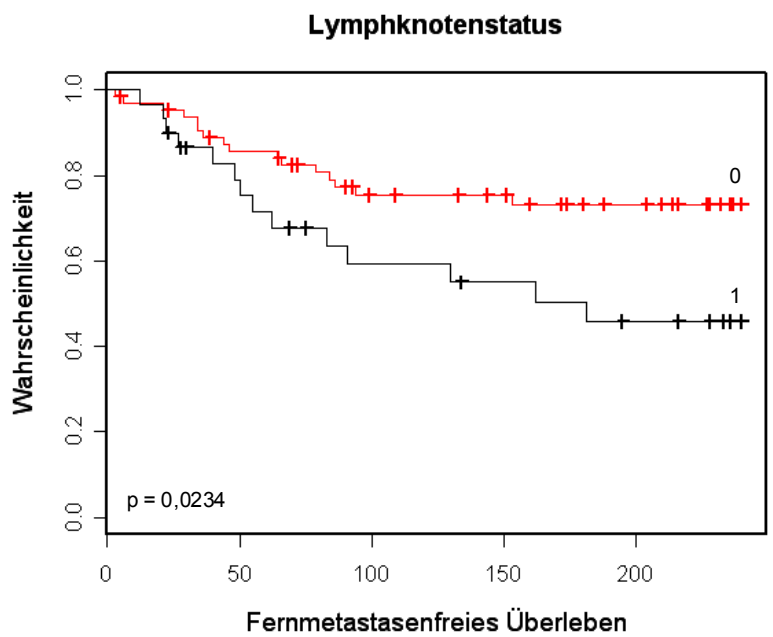
**Abbildung 5: Korrelation von HER-2 FISH-Signalen mit dem fernmetastasenfreien Überleben (<1,7 versus ≥1.7 Signale)**



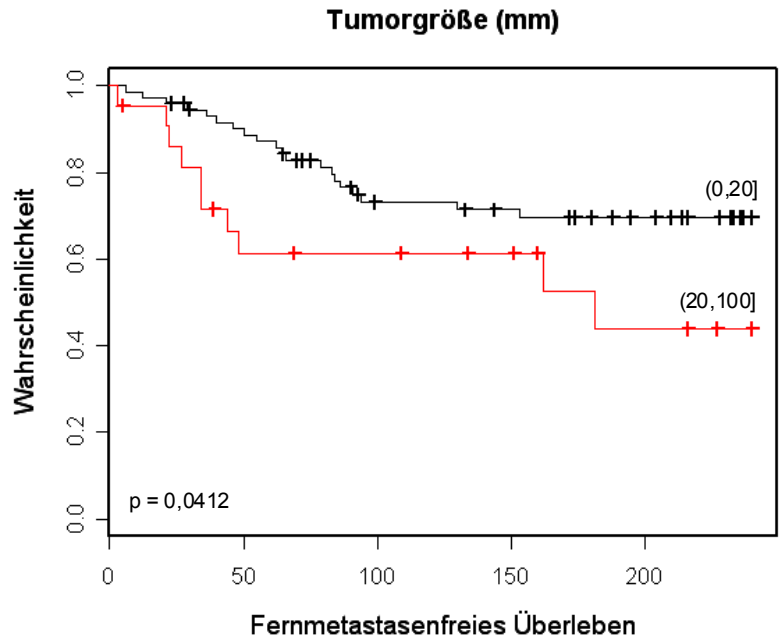
**Abbildung 6: Korrelation von CEP 17-Signalen mit dem fernmetastasenfreien Überleben (<1,5 versus ≥1.5 Signale)**



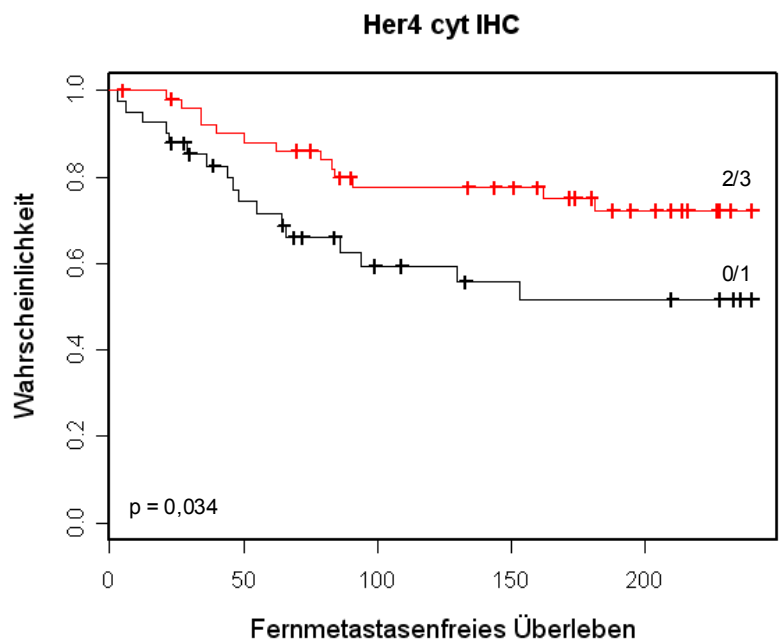
**Abbildung 7: Korrelation der GRB-7/CEP 17 Ratio mit dem fernmetastasenfreien Überleben (<1,1 versus  $\geq 1.1$  Signale)**



**Abbildung 8: Korrelation des Lymphknotenstatus mit dem fernmetastasenfreien Überleben (0=negativ, 1=positiv)**

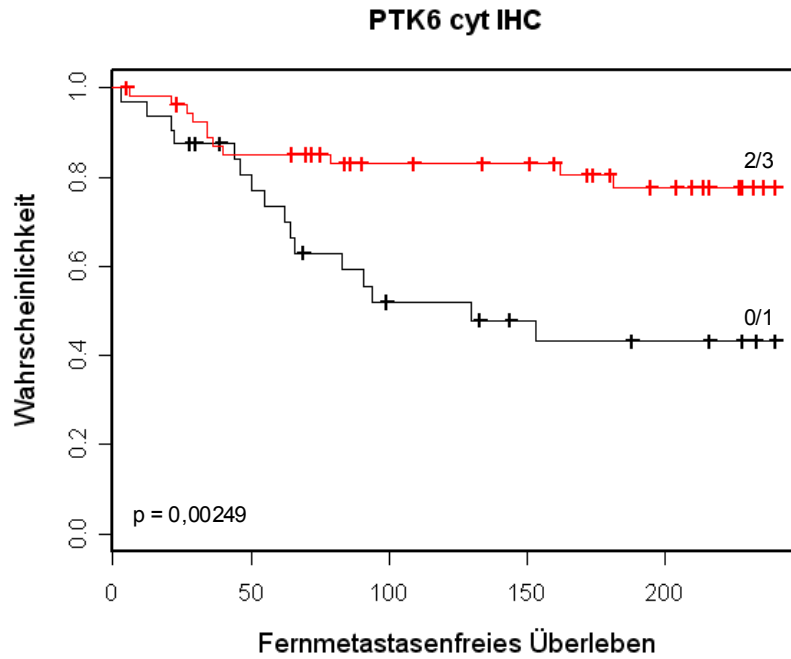


**Abbildung 9: Korrelation der TumorgroÙe mit dem fernmetastasenfreien Überleben ( $\leq 20\text{mm}$ ,  $>20\text{mm}$ )**

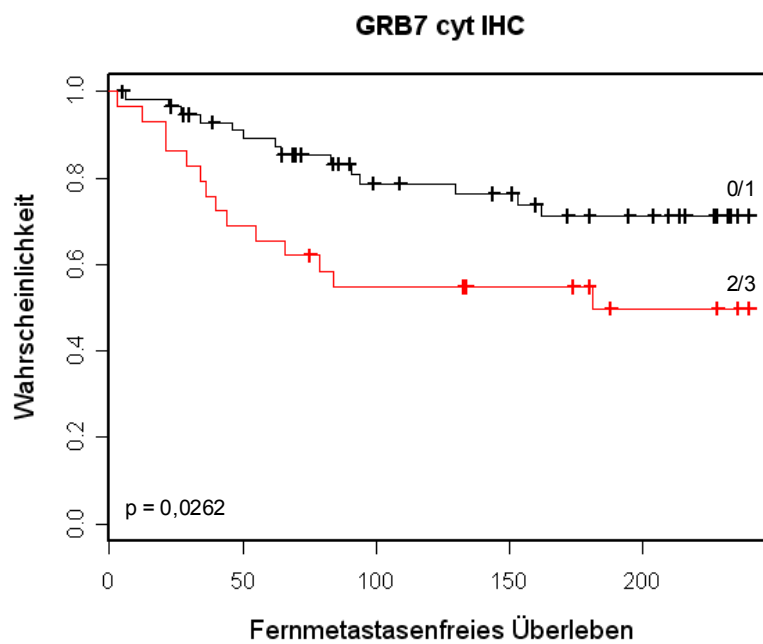


**Abbildung 10: Korrelation von IHC HER-4 mit dem fernmetastasenfreien Überleben (IHC 0, 1+; IHC 2+/3+)**





**Abbildung 11: Korrelation von IHC PTK-6 mit dem fernmetastasenfreien Überleben (IHC 0, 1+; IHC 2+/3+)**



**Abbildung 12: Korrelation von IHC GRB-7 mit dem fernmetastasenfreien Überleben (IHC 0, 1+; IHC 2+/3+)**

#### 4.4.2 Multivariate Analyse

Alle Parameter, die in der univariaten Analyse einen p-Wert von  $\leq 0,15$  zeigten, gingen in die multivariate Analyse ein. Damit wurde untersucht, welche der verschiedenen Parameter in Kombination miteinander das metastasenfrem Überleben im Beobachtungszeitraum von 240 Monaten am stärksten beeinflussen. In diese Analyse gingen von den FISH Ergebnissen (aufgrund mangelnder Signifikanz in der univariaten Analyse) nur HER-2 und #17 mit ein: Der Einfluss dieser beiden Parameter war aber nicht ausreichend groß, sie wurden deshalb von dem Programm ausselektiert.

Die multivariate Analyse zeigte, dass die TumorgroÙe, der Lymphknotenstatus und die Überexpression von HER-2 Protein mit dem Auftreten von Fernmetastasen positiv korrelieren (Koeffizienten 1,013 bzw. 0,546 und 0,910). Die TumorgroÙe hatte den größten Einfluss auf das metastasenfrem Überleben mit einem Risikofaktor von 2,754, der Lymphknotenstatus zeigte einen Risikofaktor von 2,484, die HER-2 Protein-Überexpression von 1,727. Demnach bedeuten eine hohe TumorgroÙe, ein positiver Lymphknotenstatus und eine HER-2 Überexpression eine schlechtere Prognose. Die PTK-6 Proteinexpression beeinflusste das metastasenfrem Überleben invers mit einem Koeffizienten von  $-0,984$  und einem Risikofaktor von 0,374 und scheint damit (wie schon von Aubele et al. 2007 und 2008 gezeigt) mit einem günstigeren Verlauf der Erkrankung in Verbindung zu stehen. Sie konkurriert im Endergebnis mit der Proteinexpression von HER-4, wenn man nach der schrittweisen Selektion IHC HER-4 wieder mit aufnimmt, ersetzt es IHC-PTK-6. Dieses Konkurrenzverhalten der beiden Proteine ist bekannt und wurde bereits beschrieben (Aubele et al., 2007, 2008). Für die untersuchten Gene konnte auf DNA-Ebene in der multivariaten Analyse kein signifikanter Einfluss auf den klinischen Verlauf gezeigt werden.

Um die Ergebnisse für die multivariate Analyse graphisch darzustellen, wurde für jede Patientin ein multivariater Prognosefaktor (PF) berechnet (Aubele et al, 1995). Für die erste multivariate Analyse wurde folgende Formel benutzt:

$$PF = 0.773 * \text{Lymphknotenstatus} + 0.75 * \text{TumorgroÙe} + 0.478 * \text{IHC HER-2} - 0.976 * \text{IHC HER-4}.$$

Entsprechend diesem Wert wurden die Patientinnen unterteilt in: min-Wert =  $-2.45$ , Median =  $-0.52$ , max-Wert =  $1.96$  (siehe Abb. 13).

Nach dem Hinzufügen von IHC PTK-6 bzw. dem Austausch von IHC HER-4 durch IHC PTK-6 wurde folgende Formel benutzt:

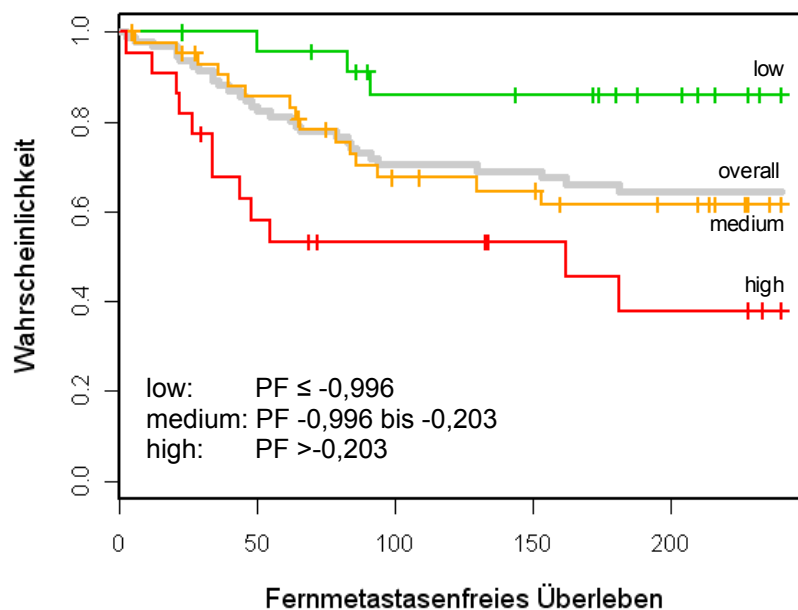
$PF = 0.910 * \text{Lymphknotenstatus} + 1.013 * \text{Tumorgröße} + 0.546 * \text{IHC HER-2} - 0.984 * \text{IHC PTK-6}$

Auch hier wurden die Patientinnen unterteilt in: min-Wert = -2.95, Median = -0.51, max-Wert = 2.68 (siehe Abb. 14).

Die so eingeteilten Gruppen wurden der Kaplan Meier Analyse zugeführt. Die Kurven (Abbildungen 13 und 14) zeigen, dass die Patientinnen mit einem niedrigen PF seltener Fernmetastasen bekamen als Patientinnen mit einem höheren PF.

**Tabelle 8: Ergebnis der multivariaten Analyse für ein metastasenfrees Überleben der Patientinnen (Gesamt-p-Wert <0,001)**

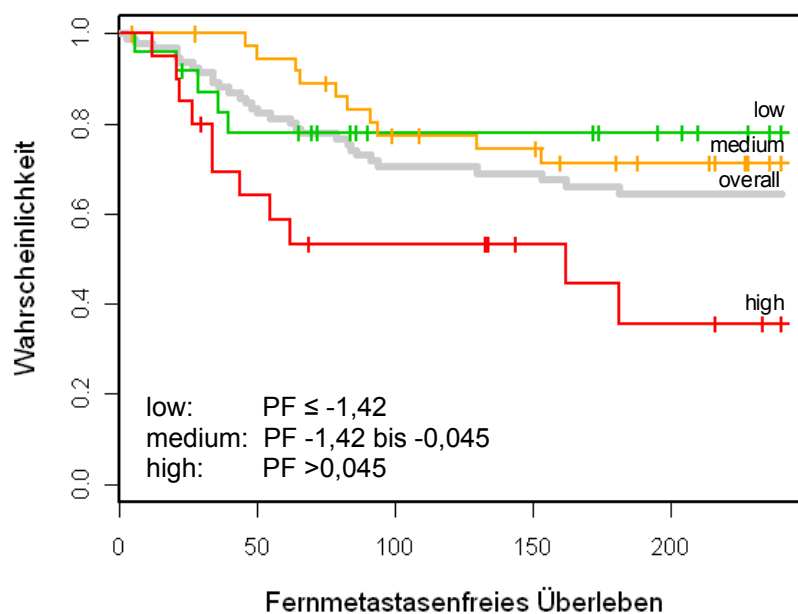
Parameter	p-Wert	Koeffizient	Risikofaktor
IHC HER-4	0.0030	-0.976	0.377
Tumorgröße	0.0220	0.750	2.118
IHC HER-2	0.0082	0.478	1.613
Lymphknotenstatus	0.0460	0.773	2.165



**Abbildung 13: Darstellung des Ergebnisses der multivariaten Analyse. Die Kaplan Meier Kurve zeigt das fernmetastasenfreie Überleben der 90 Patientinnen über 240 Monate. Die Einteilung der Patientinnen in drei Gruppen erfolgte nach dem PF: Niedriger PF (≤ -0.996): 24 Patientinnen, mittlerer PF (-0.996 bis -0.203): 44 Patientinnen, hoher PF (>0.203): 22 Patientinnen. Die durchschnittliche Fernmetastasenfreiheit ist in grau abgebildet.**

**Tabelle 9: Ergebnis der multivariaten Analyse für ein metastasenfreies Überleben der Patientinnen nach Austausch von IHC HER-4 durch PTK-6 (Gesamt-p-Wert <0,001)**

Parameter	p-Wert	Koeffizient	Risikofaktor
IHC PTK-6	0,00092	- 0,984	0,374
Tumorgröße	0,0058	1,013	2,754
IHC HER-2	0,0035	0,546	1,727
Lymphknotenstatus	0,024	0,910	2,484



**Abbildung 14: Darstellung des Ergebnisses der multivariaten Analyse nach Austausch von IHC HER-4 durch PTK-6. Die Kaplan Meier Kurve zeigt das fernmetastasenfreie Überleben der 82 Patientinnen über 240 Monate. Die Gruppierung der Patientinnen in drei Gruppen erfolgte nach dem PF: Niedriger PF ( $\leq -1,42$ ): 24 Patientinnen, mittlerer PF (-1,42 bis -0,045): 38 Patientinnen, hoher PF  $> -0,045$ ): 20 Patientinnen. Die durchschnittliche Fernmetastasenfreiheit ist in grau abgebildet.**

## 5 DISKUSSION

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau, es erkranken weltweit über einer Million Frauen pro Jahr (Janni, Mammakarzinom-Manual, 2007). Hereditäre Störungen, Umweltfaktoren und hormonelle Einflüsse spielen eine Rolle bei der Entstehung, die genaue Ätiologie ist allerdings noch weitgehend ungeklärt (Böcker, Denk, Heitz, Pathologie, 2004). Vor Therapiebeginn werden verschiedene Prognosefaktoren bestimmt, um den individuellen Krankheitsverlauf jeder Patientin möglichst genau abzuschätzen. Der wichtigste Faktor für die Prognose ist die Ausbreitung des Tumors, aber auch morphologische Kriterien (der Tumortyp) haben große prognostische Bedeutung. Der Steroidhormon-Rezeptorstatus wird beim Mammakarzinom grundsätzlich bestimmt, da Östrogen- und Progesteronrezeptor-exprimierende Tumoren bestimmte Behandlungsschemata benötigen. Der transmembrane Wachstumsfaktor-Rezeptor HER-2/neu liegt in ca. 20-30% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert vor, was in der Regel mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung (Slamon et al., 1987 u. 1989) einhergeht. Der Rezeptorstatus wird routinemäßig im Rahmen der Primärdiagnostik des Mammakarzinoms geprüft. Er ist der wichtigste prädiktive Wert für das Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Inc., South San Francisco, CA). Da aber in mehr als der Hälfte der Fälle die Tumore eine primäre Resistenz gegen Trastuzumab aufweisen (Baselga et al., 1996, Cobleigh et al., 1999, Vogel et al. 2002), müssen langfristig noch weitere Targets oder andere Angriffspunkte gefunden werden.

Vielversprechend scheinen das Adaptermolekül GRB-7, welches in den meisten Mammakarzinomen mit 17q11–21 Amplifikation mit HER-2/neu co-amplifiziert ist (Kauraniemi et al., 2006) und die rezeptorlose Tyrosinkinase PTK-6, welche in ca. 2/3 der Mammakarzinome überexprimiert vorliegt (Aubele et al. 2007, Ostrander et al., 2007, Born et al., 2005, Llor et al., 1999, Mitchell et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene HER-2, GRB-7 und PTK-6 mittels FISH-Technik untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob eine Amplifikation und/oder Überexpression dieser Gene untereinander in Zusammenhang steht und/oder ob sie mit der Immunhistochemie, der mRNA, den klinischen und histopathologischen Parametern oder Verlaufsdaten von mehr als 20 Jahren (Fernmetastasierung) korreliert.

## 5.1 Untersuchte Gene

### 5.1.1 HER-2

HER-2/neu oder ErbB2 liegt auf Chromosom 17q12 und ist von den untersuchten Genen zweifellos das am besten charakterisierte. Es kodiert für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor vom Tyrosinkinase-Typ, der in ca. 30% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert und/oder amplifiziert vorliegt (Slamon et al., 1987 u. 1989, Pauletti et al., 1996). Eine erhöhte Expression dieses Gens geht mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf (Slamon et al., 1987 u. 1989), einer Herunterregulierung des Hormonrezeptorstatus (Konecny et al., 2003) sowie mit einer schlechten Ansprechrate auf Tamoxifen (Wright et al., 1992, Borg et al., 1994, Carlomagno et al., 1996) einher. Die prognostische Relevanz einer HER-2-Überexpression ist noch nicht ausreichend geklärt, es ist jedoch gesichert, dass ein positiver HER-2/neu-Status prädiktiv für das Ansprechen auf eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab ist (Yamauchi et al., 2001). Seit 1998 wird Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Inc., South San Francisco, CA) bei metastasierten HER-2/neu überexprimierenden Mammakarzinomen, seit 2006 auch in der adjuvanten Therapie eingesetzt.

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen das HER-2/neu-Onkoprotein gerichtet ist. Der genaue Wirkmechanismus konnte noch nicht vollständig identifiziert werden, *in vitro* wurden jedoch verschiedene zelluläre und molekulare Auswirkungen beschrieben (Nahta & Esteva, 2003, 2006). HER-2 aktiviert den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg und den Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Signalweg. Trastuzumab bindet von außen an den HER-2 Rezeptor und reduziert die Signalübertragung, was zu einer Erhöhung des p27<sup>Kip1</sup> Levels und damit zum Anhalten des Zellzyklus in der G1 Phase und zur Apoptose der Zelle führt. Es wird ebenfalls diskutiert, ob Trastuzumab die Aufnahme des Rezeptors in die Zelle und dadurch dessen Abbau und eine daraus folgende verminderte Signalübertragung bewirkt (Baselga et al., 2001).

Eine sekundäre Trastuzumabresistenz könnte mit der Herunterregulation der Expression des Rezeptors erklärt werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dies tatsächlich der Fall ist, da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass sich die Anzahl der HER-2-Rezeptoren bei einer Therapie mit Trastuzumab nicht ändert (Arnould et al., 2006, Gennari et al., 2004, Burstein et al., 2003). Ob sich die Aktivität der Rezeptoren während der Therapie mit Trastuzumab verändert, ist allerdings unbekannt. Falls dies der Fall ist, könnte das ein Grund für eine sekundäre Resistenz sein.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass Trastuzumab in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien Apoptose durch Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity = ADCC) induziert (Gennari et al., 2004, Cooley et al., 1999, Stockmeyer et al., 2003). Für diesen Mechanismus sind Natürliche Killerzellen (NK) von großer Bedeutung. Repka et al. verabreichten 2003 Patientinnen, deren HER-2 überexprimierendes Mammakarzinom trotz verschiedener systemischer Therapien weiter fortgeschritten war, eine niedrige Dosis Interleukin 2, welches die Anzahl der NK erhöhen sollte (Repka et al., 2003). Dass trotz einer Erhöhung der NK-Population keine erhöhte Ansprechrate festgestellt werden konnte, wurde mit einer vorliegenden Immunsuppression der Patientinnen mit weit fortgeschrittenem metastasiertem Mammakarzinom erklärt. Um genauere Erkenntnisse über die Rolle der ADCC in der Wirkung von Trastuzumab zu erlangen, werden noch weitere Studien nötig sein.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass bei 66-89% der mit Herceptin® behandelten Patientinnen die erwartete Wirkung ausblieb (Review Natha, 2006). Daher muss geklärt werden, was der Grund für das relativ hohe Therapieversagen sein könnte und welche anderen Behandlungsansätze es gibt, um das HER-2/neu-überexprimierende Mammakarzinom in den Griff zu bekommen und die mediane Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit und die Überlebenszeit der Patientinnen zu verlängern.

Wie bereits erwähnt weisen mehr als die Hälfte der Patientinnen eine primäre Resistenz gegen Trastuzumab auf (Baselga et al., 1996, Cobleigh et al., 1999, Vogel et al. 2002). Aber auch die meisten Patientinnen, die initial auf die Therapie mit Trastuzumab ansprechen, entwickeln nach ca. einem Jahr eine sekundäre Resistenz. Erklärungen für die primäre oder sekundäre (z.B. durch die Behandlung ausgelöste) Trastuzumabresistenz sind in der Literatur zahlreich zu finden, jedoch ist keine davon vollständig gesichert. Ein möglicher Mechanismus, der eine Resistenz verursachen könnte, ist die Unterbrechung der Bindung des Wirkstoffes an sein Zielprotein. Das Membran-assoziierte Glykoprotein Mucin-4 (MUC4) bindet an HER-2 und maskiert dadurch den Rezeptor. Somit wird Trastuzumab daran gehindert, effektiv zu binden und die Signalübertragung zu reduzieren (Price-Schiavi et al., 2002, Nagy et al., 2005). Eine weitere Erklärung liefern die anderen Mitglieder der HER- Familie. Trastuzumab wirkt HER-2 spezifisch, d.h., es reduziert die von HER-2 Hetero- oder Homodimeren ausgelöste Signalkaskade, nicht jedoch die von anderen HER-Rezeptordimeren induzierten

Signalkaskaden. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, mehrere HER-Rezeptoren gleichzeitig zu blockieren.

Die wachstumshemmenden Eigenschaften von Trastuzumab hängen teilweise von dem Cyclinabhängigen Kinase-inhibierendem Protein p27<sup>Kip1</sup> ab. Trastuzumab erhöht die Halbwertszeit von p27<sup>Kip1</sup>, indem es die Cyclin E/Cyclin-dependent kinase (CDK) 2-vermittelte Phosphorylierung von p27<sup>Kip1</sup> vermindert und damit den anschließenden ubiquitin-abhängigen Abbau blockiert (Le et al., 2003). Erhöhte IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) Signale könnten zur Herunterregulierung von p27<sup>Kip1</sup> und damit zur Bildung einer Trastuzumabresistenz führen. Lu et al. zeigten 2001, dass die trastuzumababhängige Wachstumsinhibition in Brustkrebszellen, welche gleichzeitig HER-2 und IGF1R überexprimierten, verloren ging und sich nach der Gabe einer IGF1R-Blockers wieder erholte (Lu et al., 2001). Natha et al. zeigten kürzlich, dass ein Crosstalk zwischen IGF1R und HER-2 stattfindet. IGF1R interagiert mit HER-2 und induziert die Phosphorylierung in trastuzumabresistenten Zellen, jedoch nicht in trastuzumabsensiblen Zellen (Nahta et al., 2005). Die Inhibierung von IGF1R konnte im *in-vitro* Modell die Trastuzumabsensibilität wieder herstellen. Das verdeutlicht das Potential dieses Signalweges als mögliches Therapieziel für eine Therapie gegen trastuzumabresistente Mammakarzinome (Nahta et al., 2005).

Nagata et al. konnten zeigen, dass die Herunterregulierung von PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) den PI3K/Akt Signalweg erhöhte und dadurch ein erneutes Wachstum der mit Trastuzumab behandelten HER-2-überexprimierenden Brustkrebszellen verursachte. Bei Patientinnen mit HER-2 überexprimierenden Mammakarzinomen ging die Abwesenheit von PTEN mit einem schlechteren Ansprechen auf Trastuzumab einher (Nagata et al., 2004). In Zellen, welche PTEN nicht exprimierten und daher eine erhöhte PI3K/Akt Signalisierung aufwiesen, konnte ein PI3K Inhibitor die Trastuzumabsensibilität *in vitro* und *in vivo* wiederherstellen. Das bedeutet, dass PTEN eine prädiktive Aussagekraft für die Trastuzumabresistenz besitzen könnte, und dass PI3K-Inhibitoren in Kombination mit Trastuzumab als potentielle Therapeutika erforscht werden sollten.

Bei der Mehrheit der Patientinnen, die initial auf Trastuzumab ansprechen, kann ein Fortschreiten der Erkrankung innerhalb eines Jahres, also eine sekundär auftretende Resistenz, beobachtet werden. Trastuzumab mit einem neuen Therapeutikum zu kombinieren



und/oder neue Strategien gegen HER-2 zu entwickeln, könnten die Dauer und Effektivität der Ansprechrate erhöhen. Viele neue Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren befinden sich derzeit in der präklinischen oder frühen klinischen Phase der Entwicklung. Auf einige dieser Substanzen wird in den folgenden Absätzen eingegangen.

Der rekombinante humanisierte HER-2 monoklonale Antikörper Pertuzumab (auch unter den Namen 2C4 oder Omnitarg® bekannt, Genentech, San Francisco, CA) gehört zu den sogenannten Dimerisierungsinhibitoren. Er blockiert die Dimerisierung von HER-2-Rezeptoren sowie die Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der HER-Familie (Agus et al., 2002), wodurch das Tumorwachstum verlangsamt werden soll. Er blockiert die Signalisierung von allen HER-2-Rezeptordimeren, selbst in Zellen mit normaler HER-2 Expression. Ob dies eine Auswirkung auf die Toxizität der Substanz hat, ist bisher noch nicht bekannt.

Trastuzumab und Pertuzumab binden an verschiedene Epitope der extrazellulären Domäne von HER-2. Trastuzumab bindet die Domäne IV (Cho et al., 2003), während Pertuzumab in der Nähe der Kreuzung der Domänen I,II und III bindet (Franklin et al., 2004). In einer Therapie mit beiden Substanzen (Trastuzumab und Pertuzumab) arbeiten diese synergistisch und induzieren in HER-2 überexprimierenden, nicht vorbehandelten Brustkrebszellen Apoptose (Nahta et al., 2004). Im Falle von trastuzumabresistenten Brustkrebszellen konnte jedoch keine statistisch signifikant bessere Wirksamkeit nachgewiesen werden (Tanner et al., 2004, Nahta et al., 2005). Die genauen Gründe für diese Kreuz-Resistenz der trastuzumabresistenten Zellen zu dem alternativen HER-2-Antikörper sind noch nicht geklärt. Es könnte an Aberrationen in dem Protein HER-2 selbst oder in stromabwärts liegenden Signalwegen liegen, welche eine Resistenz für verschiedene anti-HER-2 Antikörper hervorruft.

Zusätzlich zu den Antikörpern, welche gegen die extrazelluläre Domäne von HER-2 gerichtet sind, wurden Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt, welche direkt die zytoplasmatische Tyrosinkinase der Wachstumsfaktorrezeptoren inhibieren. Einige dieser Substanzen wirken auf mehr als einen Rezeptor der HER-Familie.

CI-1033 (auch bekannt als PD183805; Pfizer, New York, NY) ist ein in Tablettenform vorliegender pan-HER-Tyrosinkinaseinhibitor, welcher irreversibel alle HER-Rezeptoren

blockiert (Rusnak et al., 2001). Momentan wird CI-1033 für Patientinnen mit metastasierendem, trastuzumabresistentem Mammakarzinom getestet. Lapatinib (auch bekannt als GSK572016, GlaxoSmithKline; Research Triangle Park, NC) ist ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor, welcher HER-1 und HER-2 inhibiert. Erste klinische Studien zeigen Wirksamkeit, vor allem bei fortgeschrittenem, metastasiertem Mammakarzinom (Burris, 2004). Lapatinib zeigt beachtliche *in vitro* und *in vivo* Aktivität, welche zum Wachstumsstop und/oder zur Apoptose in HER-1- und HER-2-abhängigen Tumorzelllinien führt. Wie auch bei anderen Tyrosinkinaseinhibitoren ist die Bindung von Lapatinib reversibel. Im Vergleich zu z.B. Gefitinib oder Erlotinib werden jedoch bessere Ergebnisse festgestellt, da die Dissoziation des Wirkstoffes vom Rezeptor langsamer verläuft und daher die Wirkung länger anhält. Eine Kombination von Lapatinib und anti-HER-2 Antikörpern erhöhte die Apoptoserate in HER-2-überexprimierenden Brustkrebszellen (Xia et al., 2005). Momentan wird die Effektivität und die Sicherheit von Lapatinib als Monotherapie für Patientinnen, deren Krankheit trotz einer Trastuzumabtherapie weiter fortschritt, in einer Phase II Multicenterstudie evaluiert. Kürzlich zeigten Konecny et al. (2006), dass Lapatinib zusammen mit Trastuzumab einen synergistischen, wachstumshemmenden Effekt in Brustkrebszelllinien aufwies. Lapatinib behielt seine Aktivität auch gegen Zelllinien, welche über eine lange Zeit mit Trastuzumab behandelt wurden (Konecny et al., 2006).

Weil die Trastuzumabresistenz ein bedeutendes klinisches Problem darstellt, welches durch das ausgleichende Signalisieren anderer HER-Rezeptoren verursacht werden könnte, ist der Gebrauch von multi-HER-Inhibitoren, wie CI1033 und Lapatinib, eine vielversprechende neue therapeutische Strategie für Patientinnen mit Trastuzumabresistenz.

In dieser Arbeit zeigen 54 von 146 Fällen (37%) eine HER-2 Amplifikation. Die statistische Auswertung ergab, dass diese Ergebnisse auf DNA-Ebene signifikant mit den bereits im Institut vorliegenden Daten zur mRNA- und einer Proteinexpression korrelierten. Damit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit jenen bisheriger Studien überein. Diese zeigten, dass eine erhöhte Expression des Rezeptors meist mit einer Amplifikation des Gens oder einer Polysomie des Chromosoms 17 einhergeht (Slamon et al., 1989). Einige Studien widersprechen diesem Ergebnis (Dissertation Martina Born, 2006), was damit zusammenhängen könnte, dass Unterschiede zwischen den Kohorten vorlagen oder dass unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung des Genkopienstatus benutzt wurden.

In der hier durchgeführten univariaten Analyse korrelierte eine erhöhte HER-2- und #17-Signalfrequenz signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen. Die HER-2/#17 Ratio, die mRNA Expression und die Proteinexpression beeinflussten das metastasenfrem Überleben nicht statistisch signifikant. Auf Grund mangelnder Signifikanz in der univariaten Analyse gingen von den FISH-Ergebnissen nur HER-2 und #17 in die multivariate Analyse mit ein, beide Parameter waren jedoch multivariat nicht signifikant. IHC-HER-2 ging, trotz der mangelnden Signifikanz in der univariaten Analyse (Selektionswert: p-Wert  $\leq 0,05$ ) in die multivariate Analyse mit ein (Selektionswert: p-Wert  $\leq 0,15$ ). Es zeigte sich, dass die Expression des HER-2-Rezeptors, zusammen mit der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus, das Auftreten von Fernmetastasen mit einem Koeffizienten von 0,546 und einem Risikofaktor von 1,727 direkt beeinflussten. Dies steht im Einklang mit dem Großteil der veröffentlichten Literatur über HER-2.

HER-2 und GRB-7 liegen im Rahmen des HER-2/neu Amplikons meist gemeinsam amplifiziert und überexprimiert vor. An Kombinationstherapien gegen diese beiden Moleküle wird intensiv geforscht um die Ansprechrate auf die zielgerichteten Therapien des HER-2-überexprimierenden Mammakarzinoms zu erhöhen. Einige Ansätze für diese Kombinationstherapie werden in Kapitel 5.1.2. erläutert.

### 5.1.2 GRB-7

GRB-7 (Growth factor receptor-bound protein-7) ist ein Adaptormolekül, dessen Gen auf Chromosom 17q11-21 in der unmittelbaren Nähe des HER-2/neu-Gens aufzufinden ist. Es interagiert mit verschiedenen Signaltransduktionsmolekülen (Shen et al., 2004) und ist in den meisten Mammakarzinomen mit 17q11-21 Amplifikation mit HER-2/neu co-amplifiziert (Kauraniemi et al., 2006) und mit HER-3 und HER-4 häufig co-exprimiert (Fiddes, et al., 1998).

GRB-7 kann mit >20 Adaptermolekülen interagieren, darunter auch die Mitglieder der HER-Familie (Stein et al., 1994). Es wird angenommen, dass GRB-7 für wichtige zelluläre und physiologische Funktionen, wie zum Beispiel Signaltransduktion und Zellmotilität eine Rolle spielt (Cariou et al., 2004, Lim et al., 2004, Riedel et al., 2004). Die GRB-7 Überexpression ist ausserdem für die Aktivierung des Akt Signalweges und die Tyrosinphosphorylierung von HER-2 wichtig (Bai et al., 2008).

GRB-7 enthält eine SH2 (Src-homology 2) Domäne. Diese kann in einer großen Anzahl von Proteinen gefunden werden und vermittelt Signaltransduktionswege, indem sie an spezifische phosphorylierte Tyrosinreste ihrer Zielproteine bindet. Eine frühere Studie zeigte, dass GRB-7, vermutlich durch seine SH2 Domäne, vorzugsweise mit der phosphorylierten Form von HER-2 interagiert (Stein et al., 1994). Der genaue Mechanismus der Aktivierung der HER-2 Phosphorylierung durch GRB-7 ist jedoch noch unbekannt.

GRB-7 wurde durch seine Assoziation mit Focal adhesion kinase, phosphoinositides, Ephrin receptor (EphB1) und Calmodulin (Han et al., 2002, 2000, Shen. et al., 2002, Li. et al., 2005) mit der Zellmotilität in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass GRB-7 sich negativ auf die Prognose bei Ösophaguskarzinomen auswirkt (Tanaka et al., 1998) und dass es wichtig für die Tumorprogression ist (Tanaka et al., 1997, Han, & Guan, 1999, Wands & Sugimachi, 1998, Tanaka et al., 2000). Kao et al. konnten 2006 zeigen, dass ein Knockdown der GRB-7 Expression in Brustkrebszellen, welche eine HER-2 Amplifikation aufwiesen, einen Rückgang der Zellproliferation verursachte (Kao et al., 2006).

Durch Herunterregulation von GRB-7 auf mRNA Ebene, entweder mittels anti-sense oder siRNA Technologie, konnten die invasiven (Tanaka et al., 1998) oder proliferativen (Kao & Pollack, 2006) Eigenschaften der Krebszellen inhibiert werden. Das Eingreifen auf mRNA-Ebene *in vitro* hat folglich schon vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Pero et al. fanden 2007 eine signifikante Inhibierung der Proliferation in SK-BR-3 Brustkrebszellen, welche mit dem GRB-7 targeting Peptid, G7-18NATE-P behandelt wurden. Dieses Peptid bindet spezifisch an die SH2 Domäne von GRB-7 und inhibiert dadurch die Assoziation von GRB-7 mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen (Pero et al., 2002; Tanaka et al., 2006). Es hemmt zwischen 64% und 98% der Zellproliferation in verschiedenen Zelllinien. Die Experimente von Pero et al (2007) zeigten auch, dass die G7-8NATE-konjugierten Peptide in der Lage sind, die Proliferation von verschiedenen Brustkrebszellen zu inhibieren (Pero et al., 2007). Durch eine Kombination von Doxorubicin und dem G7-18NATE-P Peptid konnte eine zusätzliche Inhibierung der Proliferation erreicht werden. Die mittlere effektive Konzentration von Doxorubicin konnte durch das Peptid um 56% bzw. 84% (je nach Konzentration des Peptids) gesenkt werden (Pero et al., 2007). Eine Kombination von Herceptin® und dem G7-18NATE-P Peptid resultierte in einer 46%igen Abnahme der mittleren effektiven Konzentration von Herceptin®.

Diese Experimente zeigten, dass das auf GRB-7 ausgerichtete Peptid zusammen mit Doxorubicin und/oder Herceptin® kooperativ die Proliferation der Brustkrebszelllinien inhibiert (Pero et al., 2007). Da die meisten Chemotherapeutika in suboptimalen Dosen gegeben werden um die unerwünschten Nebenwirkungen zu verringern, könnte die Kombinationstherapie von Chemotherapeutika und molekularen Therapeutika, wie das GRB-7 Peptid, ein wichtiger Fortschritt sein, um die Krebszellen effektiv zu beseitigen und die Toxizität der Medikamente zu minimieren. Das GRB-7 Peptid inhibierte auch eine HER-2 und GRB-7 überexprimierende Zelllinie, welche bisher als herceptinresistent galt (MDAMB-361) (Yakes et al., 2002). Man kann also davon ausgehen, dass dieses Therapeutikum, allein oder in Kombination mit traditioneller Chemotherapie, das Poteintial hat, beim herceptinresistenten Mammakarzinom zum Einsatz zu kommen.

In der vorliegenden Arbeit zeigen 86 von 146 Fällen (59%) eine GRB-7 Amplifikation. Die statistische Auswertung ergab, dass diese Ergebnisse signifikant mit der mRNA-Expression, jedoch nicht mit der Proteinexpression korrelierten. Die Daten zur mRNA- und zur Proteinexpression lagen im Institut bereits vor.

Die GRB-7/#17 Ratio korrelierte signifikant mit der HER-2/#17 Ratio, mit einer mRNA-Überexpression von GRB-7 und von HER-2 und mit der HER-2-IHC und der PTK-6-IHC, jedoch nicht mit der GRB-7-IHC. Dies zeigt eine Korrelation der GRB-7-Genamplifikation mit der GRB-7-mRNA-Expression, jedoch nicht mit der Proteinexpression. Von den histopathologischen Parametern korrelierte die GRB-7/#17 Ratio nur mit dem histologischen Grading.

In der univariaten Analyse zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen GRB-7/#17 und dem Auftreten von Fernmetastasen, dieser erreichte jedoch bei der multivariaten Analyse nicht die nötige Signifikanz. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Genamplifikation für das Fortschreiten der Krankheit nicht wichtig wäre, sondern lediglich, dass andere Parameter (wie z.B. die Tumorgöße oder der Lymphknotenstatus) einen signifikant größeren Einfluss auf das metastasenfreie Überleben haben.

Studien zeigten, dass GRB-7 auf mRNA Ebene die stärkste Assoziation mit der HER-2 - Expression in 54 mit RT-PCR analysierten Mammakarzinomen aufwies (Bieche et al., 2003). Eine Co-Expression von GRB-7 mit HER-2 konnte in 31% der Ösophaguskarzinome festgestellt werden und korrelierte signifikant mit der extramukosalen Tumordinvasion (Tanaka et al., 1997). In dieser Arbeit korrelierte die Genamplifikation von GRB-7 mit einer

Überexpression von HER-2 mRNA sowie mit einer Überexpression der GRB-7 mRNA, was die starke Korrelation der beiden Parameter GRB-7 und HER-2 auf mRNA Ebene bestätigt. Das GRB-7 Gen korreliert in dieser Arbeit nicht mit der Proteinexpression von GRB-7 jedoch mit der Proteinexpression von HER-2 und PTK-6.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die „Störung“, welche zur Veränderung des GRB-7 Proteins führt, bei der Transkription, der Translation oder durch post-translationale Modifikation entstehen muss. Daraus lassen sich wichtige Schlüsse für eine mögliche Therapie mit GRB-7 als Zielprotein ziehen. Die Intervention sollte möglichst nach der Translation stattfinden und mögliche post-translationale Veränderung des Proteins miteinbeziehen.

Eine vielversprechende Eigenschaft von GRB-7 ist sein begrenztes Vorkommen in normalem Gewebe, während viele andere Proteine, welche die SH2 Domäne enthalten, ubiquitär exprimiert werden (Margolis, 1994). Dieses begrenzte Vorkommen ist von Vorteil für die Krebstherapie, da die Nebenwirkungen von Chemotherapeutika auf gesundes Gewebe durch die begrenzte Expression vermindert werden können.

Da GRB-7 mit vielen Onkoproteinen, wie HER-1 (Margolis et al., 1992), HER-2 (Stein et al., 1994), HER-3 und HER-4 (Fiddes et al., 1998) assoziiert ist, könnte eine Kombinationstherapie mit Substanzen, welche auf diese Proteine gerichtet sind und dem GRB-7 Peptidinhistor eine neue therapeutische Möglichkeit darstellen.

Weitere Studien werden zeigen, ob eine zielgerichtete Therapie des GRB-7 Proteins bald großflächig gegen das 17q11–21 amplifizierte, herceptinresistente Mammakarzinom eingesetzt werden kann.

### 5.1.3 PTK-6

Protein Tyrosin Kinase 6 (PTK-6) ist eine rezeptorlose Tyrosinkinase, die 1994 von Mitchell et al. in metastasierten Mammakarzinomen gefunden wurde. Sie liegt in ca. 2/3 der Mammakarzinome überexprimiert vor (Aubele et al. 2007, Ostrander et al., 2007, Born et al., 2005, Llor et al., 1999, Mitchell et al., 1994). In normalem Brustdrüsengewebe ist sie nicht oder nur in geringem Maße detektierbar, die höchsten Levels an PTK-6 zeigen fortgeschrittene und metastasierte Mammakarzinome (Mitchell et al, 1994). Die genaue Auswirkung dieser Überexpression konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden und

auch die physiologische Rolle von PTK-6 in den überexprimierenden Zellen ist noch nicht ausreichend erforscht.

Nach heutigem Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass PTK-6 mit den Mitgliedern der wichtigsten Signaltransduktionswege zusammenwirkt. Sie ist ein negativer Regulator von Akt (Kamalati et al., 2000, Zhang et al., 2005) und ihre Expression im Tumorgewebe korreliert statistisch signifikant mit der Expression von PTEN, welches zur PI3K/Akt Kaskade gehört (Aubele et al., 2008). Des Weiteren beeinflusst sie die MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinase)-Kaskade und es gibt Hinweise darauf, dass auch STATs (signal transducers and activators of transcription) Ziele von PTK-6 darstellen (Liu et al., 2006, Weaver & Silva, 2007). Die Involvierung von PTK-6 in diesen Signaltransduktionswegen kann teilweise durch Crosstalk zwischen den verschiedenen Signalkaskaden erklärt werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich PTK-6 auf die posttranskriptionale Regulation auswirkt und damit die Aktivität vieler anderer Proteine beeinflusst. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine PTK-Überexpression häufig von Veränderungen anderer Moleküle begleitet wird.

Obwohl schon einige Interaktionspartner von PTK-6 identifiziert werden konnten, bleibt die genaue Rolle, die PTK-6 in der Brustkrebsentwicklung und für die Prognose spielt, unklar. Bekannterweise ist die Signaltransduktion der HER-Rezeptoren mit einer Vielzahl von zytoplasmatischen Zielproteinen, welche SH2 und/oder SH3 Domänen beinhalten, assoziiert. PTK-6 enthält sowohl SH2 als auch SH3 Domänen (Kamalati et al., 1996, Zhang et al., 2005), und es ist daher gut möglich, dass sie am Signalisierungsprozess der HER-Rezeptoren beteiligt ist.

Trotz der beschriebenen, zweifellos wichtigen, *in-vitro* Ergebnisse, bleibt die *in-vivo* Funktion von PTK-6 weitgehend ungeklärt. Über seine Relevanz bei der Induktion von Phosphorylierung, vor allem in Tumorgeweben, ist noch nicht viel bekannt. Wie bereits erwähnt, wird angenommen, dass PTK-6 in den Signaltransduktionsweg der HER-Rezeptoren involviert ist (Aubele et al., 2008, Born et al., 2005, Kamalati et al., 1996, Zhang et al., 2005). Das ist zweifellos eine sehr wichtige Erkenntnis, da die HER-Rezeptoren, und vor allem HER-2/neu, beim Mammakarzinom eine große therapeutische und prognostische Rolle spielen (Abd El-Rehim et al., 2004, Bianchi et al., 2006, Hudelist et al., 2003, Meric et al., 2002, Witton et al., 2003).

Die Konsequenz der PTK-6 Expression in verschiedenen Geweben scheint paradox zu sein. In normalem Brustepithel ist PTK-6 kaum exprimiert und oft nicht nachweisbar, in Tumorgewebe ist das Protein allerdings häufig überexprimiert (Petro et al., 2004, Zhang et al., 2005), woraus der Schluss gezogen werden könnte, dass PTK-6 Expression und Kanzerogenese zusammenhängen. Im Gegensatz dazu ist PTK-6 in einigen differenzierten Epithelgeweben, z.B. im Gastrointestinaltrakt, in der Haut (Llor et al, 1999; Haegebarth et al, 2004) und in der Prostata (Derry et al, 2003) ebenfalls nachweisbar exprimiert doch ist sie dort nicht mit maligner Entartung assoziiert. Beim Mammakarzinom kann PTK-6 mit der Differenzierung von Brustgewebe in Verbindung gebracht werden (Zhao et al., 2003). Aubele et al. beobachteten in ihrer Studie 2007 eine Korrelation der PTK-6 Proteinexpression mit dem histologischen Grad, was die Theorie, dass es eine Verbindung zwischen PTK-6 und der Differenzierung des Gewebes gibt, untermauert (Aubele et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit lag in insgesamt 44 Fällen (ca. 30%) eine erhöhte Signalfrequenz vor, in 15 der Fälle (ca. 12%) konnte das auf eine Polysomie des Chromosoms 20 zurückgeführt werden, in den restlichen ca. 28% auf eine Genamplifikation. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit einer Studie von Aubele et al. überein, in welcher ein Großteil der erhöhten Signalfrequenz von PTK-6 auf eine Polysomie 20 zurückgeführt werden konnte (Aubele et al., 2009, eingereicht). Diese Diskrepanz kann durch die Untersuchung einer deutlich größeren Kohorte mit leicht unterschiedlicher histopathologischer Zusammensetzung in der Studie von Aubele et al. erklärt werden.

Die FISH-Signale wurden mit bereits im Institut vorliegenden Daten zur Protein- und zur mRNA- Expression von PTK-6 auf vorliegende Korrelationen untersucht. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Gen-, der mRNA- und der Proteinebene. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es neben einer erhöhten Expression des Gens noch andere Mechanismen geben muss, die zur Überexpression des Proteins führen. Einige Beispiele dafür könnten posttranskriptionale und/oder posttranslationale Regulationsmechanismen sowie Protein-Protein Interaktionen sein.

Aubele et al. fanden in ihrer Studie 2009 eine signifikante Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem Histologischen Grad sowie den PTK-6 Signalen und den #20 Signalen, jedoch keine Korrelation zwischen der Ratio PTK-6/#20 und den klinisch-histologischen Parametern. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Auswirkungen auf den Tumor durch



eine Polysomie des Chromosoms 20 und nicht durch eine Genamplifikation ausgelöst werden (Aubele et al., eingereicht 2009). Sie beschrieben außerdem eine inverse Korrelation der HER-2 und HER-4 Rezeptoren mit den PTK-6- und den #20-Signalen. Die Ratio PTK-6/#20 korrelierte nicht mit den HER-Rezeptoren (Aubele et al., 2008). Auch diese Assoziationen scheinen durch die Polysomie des Chromosoms 20 und nicht durch Genamplifikation ausgelöst zu werden. In der vorgelegten Arbeit zeigte sich keine Assoziation der PTK-6-Parameter mit den klinisch-histologischen Parametern und dem HER-2-Rezeptor. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Studie von Zhao, in welcher im Brustkrebsgewebe eine Überexpression der PTK-6-mRNA positiv mit dem Hormonrezeptorstatus korrelierte (Zhao et al., 2003). Es steht ebenfalls im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie, die Born et al. veröffentlichten, in der eine Überexpression der PTK-6-mRNA positiv mit HER-2/neu Überexpression korreliert (Born et al., 2005). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt vermutlich in den unterschiedlich großen und auch etwas unterschiedlich zusammengesetzten Kohorten.

Aubele et al. konnten 2009 zeigen, dass die PTK-6 Proteinexpression, nicht aber der PTK-6-Genstatus oder die mRNA-Expression signifikant mit dem klinischen Verlauf der Patientinnen korreliert (Aubele et al., eingereicht 2009). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. In der univariaten Analyse korrelierten der Lymphknotenstatus ( $p = 0,0234$ ), die Tumorgöße ( $p = 0,0412$ ) und der Östrogenrezeptor Status alle invers mit dem metastasenfrem Überleben im Beobachtungszeitraum  $> 240$  Monate. Der histologische Grad und der Progesteronrezeptor Status korrelierten nicht. HER-4 ( $p = 0,034$ ) und PTK-6 ( $p = 0,00691$ ) korrelierten positiv mit dem metastasenfrem Überleben, d.h., Patientinnen mit hohen Levels an HER-4 und/oder PTK-6 (IHC 2+/3+) überlebten signifikant länger ohne Fernmetastasen als Patientinnen mit niedrigeren Levels (IHC 0/1+) dieser beiden Proteine.

Die multivariate Analyse zeigte, dass die Tumorgöße, der Lymphknotenstatus und die Überexpression des HER-2 Proteins das Auftreten von Fernmetastasen positiv beeinflussten. Die PTK-6 Proteinexpression ist für die Langzeitüberlebensanalyse ( $>240$  Monate) ebenfalls ein starker prognostischer Marker. Sie beeinflusste das metastasenfrem Überleben invers mit einem Koeffizienten von  $-0,984$  und einem Risikofaktor von  $0,374$ . Für den PTK-6-Genstatus wurde in der multivariaten Analyse kein signifikanter Einfluss auf die klinischen Verlaufparameter gezeigt. Die HER-4- Proteinexpression zeigte ebenfalls eine inverse Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasen und konkurrierte in der schrittweisen

Selektion mit der PTK-6-Proteinexpression, da beide Parameter invers das Auftreten von Fernmetastasen beeinflussen.

Aubele et al. beschrieben 2007, dass die Proteinexpression der HER-Rezeptoren (HER-2, HER-4) für die kurzzeitige Überlebenszeitanalyse (60 und 120 Monate) starke prognostische Marker sind (HER-2 korreliert positiv, HER-4 invers). Für die Langzeitüberlebensanalyse (>240 Monate) ist PTK-6 jedoch, zusammen mit der Tumorgroße und dem Lymphknotenstatus, einer der stärksten prognostischen Marker, die HER-Rezeptoren nehmen in ihrer prognostischen Relevanz ab (Aubele et al., 2007). In dieser Arbeit wurde die multivariate Analyse für das metastasenfremie Überleben nur für den Zeitraum >240 Monate berechnet.

Bis jetzt gibt es wenige Studien, welche eine PTK-6 Genamplifikation in Karzinomen beschreiben. Bei Schmandt et al. wurden sieben Ovarialkarzinome, in denen maximal eine 3-fache Vermehrung des PTK-6-Gens vorlag, beschrieben (Schmandt et al., 2006). Die Autoren folgerten daraus, dass die Genamplifikation für die beobachtete Protein-Überexpression verantwortlich gemacht werden kann. Da in der Studie nur eine kleine Kohorte untersucht wurde, kann in Frage gestellt werden, ob diese Ergebnisse repräsentativ sind.

Aubele et al. (2009) fanden in ihrer Studie ein Maximum von acht PTK-6-Signalen (also eine 4-fache Vermehrung) vor. Im Vergleich zu Amplifikationen bei anderen Genen wie z.B. bei HER-2, wo die Gendosis oft das 20-fache übersteigt, kann die PTK-6-Amplifikation als „low-level-Amplifikation“ bezeichnet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine solche „low-level-Amplifikation“, welche in dieser Arbeit bei 33% der Tumoren vorlag, nicht der alleinige Grund für die PTK-6 Proteinüberexpression in 2/3 der Mammakarzinome ist.

Im Jahre 2007 wurde die Expression von PTK-6 zusammen mit der Expression aller HER-Rezeptoren in Brustkrebsgewebe von Aubele et al. analysiert. Sie identifizierten eine häufige Co-Expression von PTK-6 mit HER-4 (34%) und mit HER-3 (40% der Tumoren) und eine weniger häufige Co-Expression mit HER-1 oder HER-2 (< 18%). Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen PTK-6 und HER-2 auf Proteinebene gefunden werden, was im Einklang mit der mRNA Studie von Born et al. 2005 steht und die Theorie bestätigt, dass PTK-6 eine wichtige Rolle für das HER-Signalnetzwerk spielt (Aubele et al., 2007).

Zusammenfassend zeigt die hier beschriebene Studie, dass es viele potentielle Targets für die zielgerichtete Therapie des invasiven Mammakarzinoms gibt: GRB-7, welches mit HER-

2/neu auf einem Amplikon liegt und auch die Tyrosinkinase PTK-6, welche SH2 und SH3 Domänen enthält und somit die Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen modifiziert (Petro et al., 2004, Zhang et al., 2005). Um herauszufinden auf welcher Ebene (DNA, mRNA oder Protein) eine pharmakologische Intervention sinnvoll und erfolgversprechend wäre, ist es unbedingt erforderlich die genauen Auswirkung von PTK-6 auf das Tumorgewebe zu verstehen. Nach der momentanen Lage der Forschung wird davon ausgegangen, dass die Intervention auf Proteinebene oder posttranslational stattfinden sollte. Es werden jedoch noch weitere Studien nötig sein um mögliche Protein-Protein-Interaktionen zu beurteilen und weitere therapeutische Möglichkeiten zu erforschen. Wesentlich ist auch die 2007 erstmals beschriebene Zeitabhängigkeit der prognostischen Relevanz des PTK-6 Proteins in der multivariaten Überlebensanalyse (Aubele et al., 2007). Diese Zeitabhängigkeit könnte einige der sich widersprechenden Ergebnisse in der existierenden Literatur über den prognostischen Wert der HER-Rezeptoren erklären und verdeutlicht das hohe Potential von PTK-6 als neues Therapieziel.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Mammakarzinom betrifft fast jede zehnte Frau in Deutschland und ist damit nach wie vor der häufigste bösartige Tumor der Frau, dessen Sterblichkeitsrate die aller anderen Tumoren der Frau übertrifft. Dies ist einer der Gründe weshalb auf diesem Gebiet intensiv geforscht wird. Auf molekularbiologischer Ebene konzentriert sich die Forschung vor allem auf Zusammenhänge zwischen Genveränderungen (z.B. Amplifikation) und deren Einfluss auf die Entstehung und Progression der Tumore.

In dieser Arbeit wurden drei Gene quantitativ mit FISH untersucht. Zwei dieser Gene (GRB-7 und HER-2) liegen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 und sind Teil des 17q12-21 Amplikons. Das Dritte, PTK-6, liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 20 und kodiert für eine zytoplasmatische, rezeptorlose Tyrosinkinase. PTK-6 zeigte in vorherigen Arbeiten eine Korrelation mit HER-2 (Dissertation M. Born, 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, ob die ausgewählten Gene auf DNA-Ebene miteinander, sowie mit den Ergebnissen der, im Institut vorliegenden, Daten zur RNA- und Proteinebene korrelieren. Außerdem sollte herausgearbeitet werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen einer Amplifikation bzw. einer Überexpression und den klinisch-histopathologischen Parametern sowie zwischen einer Amplifikation bzw. einer Überexpression und dem Fortschreiten der Krankheit (Fernmetastasierung nach 240 Monaten) besteht.

Zu diesem Zweck wurden Tissue Mikroarrays mit Gewebe von 150 formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten invasiven Mammakarzinomen mittels FISH gefärbt und die Häufigkeit des Auftretens der oben genannten Gene ausgezählt. Die Ergebnisse wurden auf eine Korrelation miteinander sowie mit im Institut vorliegenden Daten zur Immunhistochemie, zur TaqMan Analyse, zu den klinisch histopathologischen Parametern und zu klinischen Verlaufsdaten (Fernmetastasierung) von mehr als 20 Jahren untersucht.

Bei HER-2 fanden wir eine statistisch signifikante Korrelation zwischen allen drei Ebenen (DNA, mRNA, Protein), bei GRB-7 zwischen der DNA- und der mRNA- Ebene und bei PTK-6 zeigte sich keine Korrelation zwischen den verschiedenen Ebenen.

Bei den histopathologischen Parametern korrelierte das Grading mit der HER-2/#17 Ratio und mit der GRB-7/#17 Ratio, die Tumorgroße korrelierte mit HER-2 und #17 (jedoch nicht mit der Ratio) und mit den PTK-6 Signalen.

In der univariaten Analyse im Hinblick auf die Verlaufsdaten korrelierten auf DNA-Ebene die HER-2-, die #17- und die Ratio GRB-7/#17-Signale direkt mit der Fernmetastasierung, in der multivariaten Analyse wurden sie jedoch von dem Programm wegen mangelnder Signifikanz aussortiert.

Trotz dieser Ergebnisse in der multivariaten Analyse, gehen wir davon aus, dass sowohl GRB-7 als auch PTK-6 wichtige zukünftige Targets in der Therapie von HER-2 überexprimierenden Mammakarzinomen sein können. Dazu müssen die Mechanismen, welche zur Modifikation der Zellen führen, noch besser verstanden werden, wozu weitere Studien notwendig sein werden. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann aber geschlossen werden, dass ein Eingreifen eher auf Proteinebene oder sogar posttranslational sinnvoller ist, als ein Eingreifen auf DNA- Ebene. Aus den in dieser Arbeit aufgeführten Gründen (Kardiotoxizität, primäre und sekundäre Resistenzen gegen Trastuzumab) ist es wichtig eine Alternative oder eine Ergänzung zur aktuellen Therapie von HER-2-positiven Mammakarzinomen zu finden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E., Bell J.A., Rampaul R.S., Blamey R.W., Robertson J.F., Nicholson R.I., Ellis I.O.  
Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma  
Br J Cancer 91 (2004) 1532-42

Agus D., Akita R., Fox W., Lewis G., Higgins B., Pisacane P., Lofgren J., Tindell C., Evans D., Maiese K.  
Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth  
Cancer Cell 2 (2002) 127–137

Alroy I., Yarden Y.  
The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions  
FEBS Lett 410 (1997) 83-6

Anglian Breast Cancer Study Group  
Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases  
Br J Cancer 83 (2000) 1301-8

Arnould L., Gelly M., Penault-Llorca F., Benoit L., Bonnetain F., Migeon F., Cabaret V., Fermeaux V., Bertheau P., Garnier J., Jeannin J.-F., Coudert B.  
Trastuzumab-based treatment of HER-2-positive breast cancer: an antibodydependent cellular cytotoxicity mechanism?  
Brit J Cancer 94 (2006) 259–267

Aubele M., Auer G., Voss A., Falkmer U., Rutquist L.E., Höfler H.  
Different risk groups in node-negative breast cancer: prognostic value of cytophotometrically assessed DNA, morphometry and texture  
Int J Cancer 63 (1995) 7–12

Aubele M., Auer G., Walch A.K., Munro A., Atkinson M.J., Braselmann H., Fornander T., Bartlett J.M.S.  
PTK (protein tyrosine kinase)-6 and HER-2 and 4, but not HER-1 and 3 predict long-term survival in breast carcinomas  
British Journal of Cancer (2007) 96 801 – 807

Aubele M., Walch A.K., Ludyga N., Braselmann H., Atkinson M.J., Lubner B., Auer G., Tapio S., Cooke T., Bartlett J.M.S.  
Prognostic value of protein tyrosine kinase 6 (PTK-6) for long-term survival of breast cancer patients  
British Journal of Cancer (2008) 99 1089-1095

Aubele M., Vidojkovitch S., Braselmann H., Ritterswürden D., Auer G., Atkinson M., Tapio S., Höfler H., Bartlett J.M.S.

Overexpression of PTK-6 (Breast Tumor Kinase) protein - a prognostic factor for long-term breast cancer survival- is not due to gene amplification

Eingereicht 2009, Virchows Archiv

Bai T., Luoh S.W.

GRB-7 facilitates HER-2/Neu-mediated signal transduction and tumor formation

Carcinogenesis 29 (2008) 473–479

Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C.C., Dantis L., Sklarin N.T., Seidman A.D., Hudis C.A., Moore J., Rosen P.P., Twaddell T., Henderson I.C., Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER-2 monoclonal antibody in patients with HER-2/neuoverexpressing metastatic breast cancer

J Clin Oncol 14 (1996) 737–744

Baselga J., Albanell J., Molina M., Arribas J.

Mechanism of action of trastuzumab and scientific update

Semin Oncol 28, Suppl 16 (2001) 4–11

Bland, J.M., Altman, D.G.

The logrank test

BMJ 328 (2004) 1073

Beckmann M.W., Niederacher D., Schnurch H.G., Gusterson B.A., Bender H.G.

Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity

J Mol Med. 75 (1997) 429-39

Bianchi S., Palli D., Falchetti M., Saieva C., Masala G., Mancini B., Lupi R., Noviello C., Omerovic J., Paglierani M., Vezzosi V., Alimandi M., Mariani-Costantini R., Ottini L.

ErbB-receptors expression and survival in breast carcinoma: a 15-year follow-up study

J Cell Physiol 206 (2006) 702-8

Bieche I., Onody P., Tozlu S., Driouch K., Vidaud M., Lidereau R.

Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas

Int J Cancer 106 (2003) 758–765

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U.

“Pathologie“

(Hrsg.), Urban&Fischer., München, Jena, 2004, 3. Auflage, S. 987 – 996; 169 – 198

Borg A., Baldetorp B., Fernö M., Killander D., Olsson H., Rydén S., Sigurdsson H.

ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer.

Cancer Lett 81(2) (1994) 137-44

Born M., Quintanilla-Fend L., Braselmann H., Reich U., Richter M., Hutzler P., Aubele M. Simultaneous over-expression of the HER-2/neu and PTK-6 tyrosine kinases in archival invasive ductal breast carcinomas.

J Pathol 205 (2005) 592–596

Born M.

Mammakarzinom: Quantifizierung von ausgewählten Genen  
und Untersuchung ihrer klinischen Relevanz.

Dissertation an der Technischen Universität München, Medizinische Fakultät, 2006.

Burris, H.A.

Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the  
EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib

Oncologist 9 (2004) 10-15

Burstein H.J., Harris L.N., Marcom P.K., Lambert-Falls R., Havlin K., Overmoyer B.,  
Friedlander R.J., Gargiulo Jr. J., Strenger R., Vogel C.L., Ryan P.D., Ellis M.J., Nunes R.A.,  
Bunnell C.A., Campos S.M., Hallor M., Gelman R., Winer E.P.

Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER-2-overexpressing metastatic breast  
cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as  
predictive factors, and cardiac surveillance algorithm

J Clin Oncol 21 (2003) 2889–2895

Cariou B., Berezziat V., Moncoq K., Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Le Marcis V., Burnol A.-  
F.

Regulation and functional roles of Grb14

Front. Bioscience 9 (2004) 1626–36

Carlomagno C., Perrone F., Gallo C., et al.

c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in earlystage breast  
cancer without ancillary lymph node metastases

J Clin Oncol 14 (1996) 2702–8

Chen H.Y., Shen C.H., Tsai Y.T., Lin F.C., Huang Y.P., Chen R.H.

Brk activates rac1 and promotes cell migration and invasion by phosphorylating paxillin

Mol Cell Biol 24 (2004) 10558–10572

Cho H.-S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney, Jr D.W., Leahy D.J.

Structure of the extracellular region of HER-2 alone and in complex with the Herceptin Fab

Nature 421 (2003) 756–760

Claus E.B., Schildkraut J.M., Thompson W.D., Risch N.J.

The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer

Cancer 77 (1996) 2318-24

Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D., Robert N.J., Scholl S., Fehrenbacher L., Wolter  
J.M., Paton V., Shak S., Lieberman G., Slamon D.J.

Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody  
in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after  
chemotherapy for metastatic disease

J Clin Oncol 17 (1999) 2639–2648



- Cooley S., Burns L.J., Repka T., Miller J.S.  
Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER-2/neu  
*Exp Hematol* 27 (1999) 1533–1541
- Derry J.J., Prins G.S., Ray V., Tyner A.L.  
Altered localization and activity of the intracellular tyrosine kinase BRK/Sik in prostate tumor cells  
*Oncogene* 22 (2003) 4212–4220
- Dumitrescu R.G., Cotarla I.  
Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?  
*J Cell Mol Med* 9 (2005) 208-21
- Fiddes R.J., Campbell D.H., Janes P.W., Sivertsen S.P., Sasaki H., Wallasch C., Daly R.J.  
Analysis of GRB-7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3  
*J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7717–7724
- Franklin M.C., Carey K.D., Vajdos F.F., Leahy D.J., de Vos A.M., Sliwkowski M.  
Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2–pertuzumab complex  
*Cancer Cell* 5 (2004) 317–328
- Gennari R., Menard S., Fagnoni F., Ponchio L., Scelsi M., Tagliabue E., Castiglioni F., Villani L., Magalotti C., Gibelli N., Oliviero B., Ballardini B., Da Prada G., Zambelli A., Costa A.  
Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER-2  
*Clin Cancer Res* 10 (2004) 5650–5655
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID) und RKI,  
Krebs in Deutschland  
5. Auflage, Saarbrücken 2006
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B., Senn, H.-J., Panel Members  
Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007  
*Annals of Oncology* 18 (2007) 1133–1144
- Greene M.H.  
Genetics of breast cancer  
*Mayo Clin Proc* 72 (1997) 54-65
- Haegebarth A., Nunez R., Tyner A.L.  
The intracellular tyrosine kinase Brk sensitizes non-transformed cells to inducers of apoptosis  
*Cell Cycle* 4 (2005) 1239–1246

- Han, D.C., Guan, J.L.  
Association of focal adhesion kinase with GRB-7 and its role in cell migration  
J. Biol. Chem. 274 (1999) 24425–24430
- Han D.C., Shen T.L., Guan J.L.  
Role of GRB-7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration  
J. Biol. Chem. 275 (2000) 28911–7
- Han D.C., Shen T.L., Miao H., Wang B., Guan J.L.  
EphB1 associates with GRB-7 and regulates cell migration  
J. Biol. Chem. 277 (2002) 45655–61
- Harvey A.J., Crompton M.R.  
Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation  
Oncogene 22 (2003) 5006-10
- Honrado E., Benitez J., Palacios J.  
The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications  
Mod Pathol 18 (2005) 1305-20
- Hsieh A.C., Moasser M.M.  
Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER-3  
Br J Cancer 97 (2007) 453-7
- Hudelist G., Singer C.F., Manavi M., Pischinger K., Kubista E., Czerwenka K.  
Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors  
Breast Cancer Res Treat 80 (2003) 353-61
- Hulka B.S., Moorman P.G.  
Breast cancer: hormones and other risk factors  
Maturitas 38 (2001) 103-113
- Isola J.J., Kallioniemi O.P., Chu L.W., Fuqua S.A., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Waldman F.M.  
Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer  
Am J Pathol. 147 (1995) 905-11
- Janni, W  
Mammakarzinom-Manual, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.  
11. überarbeitete Auflage ed. 2007: W. Zuckerschwend Verlag GmbH.

Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith H.S., Pinkel D., Gray J.W., Waldman F.M.

Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization

Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 2156-60

Kamalati T., Jolin H.E., Mitchell P.J., Barker K.T., Jackson L.E., Dean C.J., Page M.J., Gusterson B.A., Crompton M.R.

Brk, a breast tumor-derived non-receptor protein-tyrosine kinase, sensitizes mammary epithelial cells to epidermal growth factor

J Biol Chem 271 (1996) 30956-30963

Kamalati T., Jolin H.E., Fry M.J., Crompton M.R.

Expression of the BRK tyrosine kinase in mammary epithelial cells enhances the coupling of EGF signalling to PI 3-kinase and Akt, via erbB3 phosphorylation

Oncogene 19 (2000) 5471–5476

Kao J., Pollack J.R.

RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes

Genes Chromosomes Cancer 45 (2006) 761–769

Kaplan, E.L., Meier, P.

Nonparametric Estimation from Incomplete Observations

Journal of the American Statistical Association 53 (1958) 457-481

Kauraniemi, P., Bärlund M., Monni O., Kallioniemi, A.

New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays

Cancer Res. 61 (2001) 8235–40

Kauraniemi P., Kuukasjärvi T., Sauter G., Kallioniemi A.

Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer

Am. J. Pathol. 163 (2003) 1979–84.

Kauraniemi, P., Kallioniemi, A.

Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer

Endocr. Relat. Cancer 13 (2006) 39–49

Keefe D.L.

Trastuzumab-Associated Cardiotoxicity

Cancer 95 (2002) 1592–600

Knudson AG Jr.

Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma

Proc Natl Acad Sci USA 68 (1971) 820-823

Konecny G., Pauletti G., Pegram M., Untch M., Dandekar S., Aguilar Z., Wilson C., Rong H.M., Bauerfeind I., Felber M., Wang H.J., Beryt M., Seshadri R., Hepp H., Slamon D.J.  
Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer  
*J Natl Cancer Inst* 95 (2003) 142–153

Konecny G.E., Pegram M.D., Venkatesan N., Finn R., Yang G., Rahmeh M., Untch M., Rusnak D.W., Spehar G., Mullin R.J., Keith B.R., Gilmer T.M., Berger M., Podratz K.C., Slamon D.J.  
Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells  
*Cancer Res* 66 (2006) 1630–1639

Le X.-F. Claret F.-X., Lammayot A., Tian L., Deshpande D., LaPushin R., Tari A.M., Bast, Jr R.C.  
The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER-2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition  
*J Biol Chem* 278 (2003) 23441–23450

Li H., Sánchez-Torres J., del Carpio A.F., Nogales-González A., Molina-Ortiz P., Moreno M.J., Török K., Villalobo A.  
The adaptor GRB-7 is a novel calmodulin-binding protein: functional implications of the interaction of calmodulin with GRB-7  
*Oncogene* 24 (2005) 4206–19

Lim M.A., Riedel H., Liu F.  
Grb10: more than a simple adaptor protein  
*Front. Bioscience* 9 (2004) 387–403

Liu L., Gao Y., Qiu H., Miller W.T., Poli V., Reich N.C.  
Identification of STAT3 as a specific substrate of breast tumor kinase  
*Oncogene* 25 (2006) 4904–12

Llor X., Serfas M.S., Bie W., Vasioukhin V., Polonskaia, M., Derry, J., Abbott, C.M., Tyner, A.L.  
BRK/Sik expression in the gastrointestinal tract and in colon tumors  
*Clin Cancer Res* 5 (1999) 1767–77

Lu Y., Zi X., Zhao Y., Mascarenhas D., Pollak M.  
Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)  
*J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 1852–1857

Luoh, S.W.  
Amplification and expression of genes from the 17q11 - q12 amplicon in breast cancer cells  
*Cancer Genet. Cytogenet.* 136 (2002) 43–47

Margolis B., Silvennoinen O., Comoglio F., Roonprapunt C., Skolnik E., Ullrich A., Schlessinger J.  
High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains  
Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992) 8894–8898

Margolis B.  
The GRB family of SH2 domain proteins  
Prog Biophys Mol Biol 62 (1994) 223–244

Meric F., Lee W.P., Sahin A., Zhang H., Kung H.J., Hung M.C.  
Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer  
Clin Cancer Res 8 (2002) 361-7

Mitchell P.J., Barker K.T., Martindale J.E., et al.  
Cloning and characterisation of cDNAs encoding a novel nonreceptor tyrosine kinase, brk, expressed in human breast tumours.  
Oncogene 9 (1994) 2383–90

Muss H.B., Thor A.D., Berry D.A., Kute T., Liu E.T., Koerner F., Cirrincione C.T., Budman D.R., Wood W.C., Barcos M., Henderson I.C.  
c-erbB-2 Expression and Response to Adjuvant Therapy in Women with Node-Positive Early Breast Cancer  
N Engl J Med 330 (1994) 1260

Nagata Y., Lan K., Zhou X., Tan M., Esteva F., Sahin A., Klos K., Li P., Monia B., Nguyen N.  
PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients  
Cancer Cell 6 (2004) 117–127

Nagy P., Friedländer E., Tanner M., Kapanen A.I., Carraway K.L., Isola J., Jovin T.M.  
Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line  
Cancer Res 65 (2005) 473–482

Nahta R., Hung M.C., Esteva F.J.  
The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells  
Cancer Res 64 (2004) 2343–2346

Nahta R., Yuan L.X.H., Zhang B., Kobayashi R., Esteva F.J.  
Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells  
Cancer Res 65 (2005) 11118–11128

Nahta R., Esteva F.J.  
HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions.  
Clin Cancer Res 9 (2003) 5078–5084

- Nahta R., Esteva F.J.  
Herceptin: mechanisms of action and resistance.  
Cancer Lett 232 (2006) 123–138
- Nahta R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi G.N., Esteva, F.J.  
Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER-2-targeted therapy in human breast cancer  
Nature Clinical Practice Oncology 3 (2006) 269-280
- Nelson, M.H., Dolder, C.R.  
Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors  
Ann Pharmacother. 40 (2006) 261-269.
- Pauletti G., Godolphin W., Press M.F., Slamon D.J.  
Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization  
Oncogene 13 (1996) 63-72
- Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J.  
Global cancer statistics  
CA Cancer J Clin. 49 (1999) 33-64
- Pero S.C., Oligino L., Daly R.J., Soden A.L., Liu C., Roller P.P., Li P., Krag D.N.  
Identification of novel non-phosphorylated ligands, which bind selectively to the SH2 domain of GRB-7  
J Biol Chem 277 (2002) 11918–11926
- Petro B.J., Tan R.C., Tyner A.L., Lingen M.W., Watanabe K.  
Differential expression of the non-receptor tyrosine kinase BRK in oral squamous cell carcinoma and normal oral epithelium  
Oral Oncol 40 (2004) 1040–1047
- Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Gianni L., Baselga J., Bell R., Jackisch C., Cameron D., Dowsett M., Barrios C.H., Steger G., Huang C.S., Andersson M., Inbar M., Lichinitser M., Lang I., Nitz U., Iwata H., Thomssen C., Lohrisch C., Suter T.M., Ruschoff J., Suto T., Greatorex V., Ward C., Straehle C., McFadden E., Dolci M.S., Gelber R.D.  
Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer  
N. Engl. J. Med. 353 (2005) 1659–1672
- Pike M.C., Spicer D.V., Dahmouch L., Press M.F.  
Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation and breast cancer risk  
Epidemiol Rev 15 (1993) 17-35
- Pothos A., Plastira K., Plastiras A., Vlachodimitropoulos D., Goutas N., Angelopoulou R.  
Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma.  
Acta Histochem Cytochem. 41(3) (2008) 59-64

Price-Schiavi S.A., Epton S.J., Li P., Arango M., Rudland P.S., Yee L., Carraway K.L.  
Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell  
surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance  
Int J Cancer 99 (2002) 783–791

Repka T., Chiorean E.G., Gay J., Herwig K.E., Kohl V.K., Yee D., Miller J.S.  
Trastuzumab and interleukin-2 in HER-2-positive metastatic breast cancer: a pilot study  
Clin Cancer Res 9 (2003) 2440–2446

Richter, J., et al.  
High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression  
in urinary bladder cancer.  
Am J Pathol 157(3) (2000) 787-94

Riedel, H.  
Grb10 exceeding the boundaries of a common signaling adapter  
Front. Bioscience 9 (2004) 603–18

Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu,  
E., Martino, S., Paik, P., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, F.,  
Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil,  
S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, M.P., Ingle, J.N., Wolmark, N  
Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer  
N. Engl. J. Med. 353 (2005) 1673–84

Rubin, I., Yarden, Y.  
The basic biology of HER-2  
Ann Oncol, 12 Suppl 1 (2001) 3-8

Rusnak D.W., Affleck K., Cockerill S.G., Stubberfield C., Harris R., Page M., Smith K.J.,  
Guntrip S.B., Carter M.C., Shaw R.J., Jowett A., Stables J., Topley P., Wood E.R., Brignola  
P.S., Kadwell S.H., Reep B.R., Mullin R.J., Alligood K.J., Keith B.R., Crosby R.M., Murray  
D.M., Knight W.B., Gilmer T.M., Lackey K.  
The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential  
therapy for cancer  
Cancer Res 61 (2001) 7196–7203

Sant M., Aareleid T., Berrinol F., et al. and the EUROCORE Working Group.  
EUROCORE.3: survival of cancer patients diagnosed 1990–1994 – results and commentary  
Annals of Oncology 14 (5) (2003) 61–118

Schmandt R.E., Bennett M., Clifford S., Thornton A., Jiang F., Broaddus R.R., Sun C.C., Lu  
K.H., Sood A.K., Gershenson D.M.  
The BRK tyrosine kinase is expressed in high-grade serous carcinoma of the ovary  
Cancer Biol Ther 5 (2006) 1136-41

Shen T.L., Han D.C., Guan J.L.  
Association of GRB-7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration  
J. Biol. Chem. 277 (2002) 29069–77

- Shen, T.L. Guan, J.L.  
GRB-7 in intracellular signaling and its role in cell regulation  
Front. Biosci. 9 (2004) 192–200
- Slamon D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L.  
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene  
Science 235 (1987) 177-182
- Slamon D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G. Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A.  
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer  
Science 244 (1989) 707-712
- Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., et al.  
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2  
N Engl J Med 344 (2001) 783-92
- Statistisches Bundesamt Deutschland: Statistik der häufigsten Diagnosen bei Frauen.  
Stand 18.10.2006: [www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.phpttan](http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.phpttan)
- Stein D., Wu J., Fuqua S.A.W., Roonprapunt C., Yajnik V., D'Eustachio P., Moskow J.J., Buchberg A.M., Osborne C.K., Margolis B.  
The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER-2 in breast cancer  
EMBO J.13 (1994) 1331–40
- Stockmeyer B., Beyer T., Neuhuber W., Repp R., Kalden J.R., Valerius T., Herrmann M.  
Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells  
J Immunol 171(2003) 5124–5129
- Tanaka S., Mori M., Akiyoshi T., Tanaka Y., Mafune K., Wands J.R., Sugimachi K.  
Coexpression of GRB-7 with epidermal growth factor receptor or HER-2/erbB2 in human advanced esophageal carcinoma  
Cancer Research 57 (1997) 28–31
- Tanaka S., Mori M., Akiyoshi T., Tanaka Y., Mafune K., Wands J.R., Sugimachi K.  
A novel variant of human GRB-7 is associated with invasive esophageal carcinoma  
J. Clin. Invest. 102 (1998) 821–7
- Tanaka S., Sugimachi K., Kawaguchi H., Saeki H., Ohno S., Wands J.R.  
GRB-7 signal transduction protein mediates metastatic progression of esophageal carcinoma  
Journal of Cellular Physiology 183 (2000) 411–415
- Tanaka S., Pero S.C., Taguchi K., Shimada M., Mori M., Krag D.N., Arie S.  
Specific peptide ligand for GRB-7 signal transduction protein and pancreatic cancer metastasis  
J Natl Cancer Inst 98 (2006) 491–498



Tanner M., Kapanen A.I., Junttila T., Raheem O., Grenman S., Elo J., Elenius K., Isola J.  
Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer

Mol Cancer Ther 3 (2004) 1585–1592

Tzahar E., Yarden Y.

The ErbB-2/HER-2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: From orphanhood to multiple stromal ligands

BBA Rev Cancer 1377 (1998) M25-37

Vasioukhin V., Serfas M.S., Siyanova E.Y., Polonskaia M., Costigan V.J., Liu B., Thomason A., Tyner A.L.

A novel intracellular epithelial cell tyrosine kinase is expressed in the skin and gastrointestinal tract

Oncogene 10 (1995) 349–57

Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., Stewart S.J., Press M.

Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer

J Clin Oncol 20 (2002) 719–726

Weaver A.M., Silva C.M.

Signal transducer and activator of transcription 5b: a new target of breast tumor kinase/protein tyrosine kinase 6

Breast Cancer Res 9 (2007) R79

WHO (2003) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In: Tavassoli FA, Devilee P (eds).

IARC Press, Lyon, 9–112

Witton C.J., Reeves J.R., Going J.J., Cooke T.G., Bartlett J.M.

Expression of the HER-1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer

J Pathol 200 (2003) 290-7

Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H.V., Wheeler T.M., Hayes D.F.

American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer Arch Pathol Lab Med 131 (2007) 18

Wright C., Nicholson S., Angus B., Sainsbury J.R., Farndon J., Cairns J., Harris A.L., Horne C.H.

Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer.

Br J Cancer 65(1) (1992) 118-21

Xia W., Gerard C.M., Liu L., Baudson N.M., Ory T.L., Spector N.L.

Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2- overexpressing breast cancer cells

Oncogene 24 (2005) 6213–6221

Yakes F.M., Chinratanalab W., Ritter C.A., King W., Seelig S., Arteaga C.L.

Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action

Cancer Res 62 (2002) 4132–4141

Yamauchi H., Stearns V., Hayes D.F.

When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer

J Clin Oncol 19 (2001) 2334–2356

Zhang P., Ostrander J.H., Faivre E.J., Olsen A., Fitzsimmons D., Lange C.A.

Regulated association of protein kinase B/Akt with breast tumor kinase

J Biol Chem 280 (2005) 1982–1991

Zhao C., Yasui K., Lee C.J., Kurioka H., Hosokawa Y., Oka T., Inazawa J.

Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis

Cancer 98 (2003) 18–23

Ziegler, A., Lange, S., Bender R.

Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method

Dtsch Med Wochenschr 132 Suppl 1 (2007) 36-8

## 8 ANHANG

### 8.1 Klinische Verlaufsdaten der Patientinnen

Gesamtzahl C1, C2, Array2: 143

Survival Daten: 101 (nur C1 und C2)

FISH von 130 Fällen (PTK-6), 120 (HER-2), 127 (GRB-7)

Parameter	Gesamt	Follow-up (Fälle C1,C2)
LK-Status		
negativ	89	66
positiv	51	32
T bzw. pT		
≤ 2 cm	102	74
> 2 - ≤ 4 cm	30	21
> 4 cm	8	3
Histologisches Grading nach Elston und Ellis		
G1	14	14
G2	97	55
G3	27	27
Histologie		
duktal	118	75
tubulär	7	7
lobulär	9	9
sonstige	8	8
ER		
negativ	50	(77)
positiv	89	(20)
PrR		
negativ	67	(53)
positiv	71	(43)
Follow-up	-	95
davon Metastasen		32
Lokal Rezidiv		12
„disease“ (Metastasen und/oder Lokal Rezidiv)		37

## 8.2 pTMN-Klassifikation des Mammakarzinoms

(UICC (2002) TNM classification of malignant tumours Wiley-Liss, Inc., New York)

### Gekürzte Version:

#### pT – Primärtumor

- pTX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- pT0: kein Anhalt für Primärtumor
- pT1: Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- pT2: Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- pT3: Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- pT4: Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut

#### pN – Regionäre Lymphknoten

- pNX: regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
- pN0: keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- pN1: Metastase(n) in 1–3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren.
- pN2: Metastase(n) in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.
- pN3: Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraclavikulären Lymphknoten.

#### pM – Fernmetastasen

- pMX: Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- pM0: keine Fernmetastasen
- pM1: Fernmetastasen

#### pR – Residualtumor

- pRX: Vorliegen von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
- pR0: Residualtumor mikroskopisch sichtbar
- pR1: Residualtumor makroskopisch sichtbar

### 8.3 WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome

#### Klassifikation einer Auswahl der häufigsten Mammakarzinome

- Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (NOS)
- Invasives lobuläres Karzinom
- Tubuläres Karzinom
- Invasives kribriiformes Karzinom
- Medulläres Karzinom
- Muzinöses Karzinom und andere Muzin-reiche Tumoren
- Invasives papilläres Karzinom
- Plattenepithelkarzinom

### 8.4 Protokoll zur Durchführung der FISH- (Fluoreszenz in-situ Hybridisierungs) Technik

- 20 min Xylol I bei Raumtemperatur (RT)
- 10 min Xylol II bei RT
- 5 min Isopropanol bei RT
- Je 5 min absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 70%) bei RT
- Spülen mit PBS pH 7,0
- Citratpuffer bei 750W in der Mikrowelle zum kochen bringen. Objektträger (OT) 12 min im Citratpuffer in der Mikrowelle kochen
- Spülen in PBS
- 4,5 min Pronase E 0,05% im 37°C Wasserbad
- Spülen in PBS
- Je 5 min aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%), eiskalt
- OT auf Heizplatte trocknen
- Ca. 10µl Sonde auftragen, Deckglas aufsetzen und mit Fixogum verschließen
- Heizplatte auf 75°C erhitzen, 5 min Sonde auf OT denaturieren
- Hybridisierung in feuchter Kammer über Nacht bei 37°C (mind. 16h)
- Kurz 100ml 2x SSC + 300ml NP40 bei RT
- 2 min 100ml 2x SSC + 300ml NP40 bei 73°C
- Kurz 100ml 2x SSC + 300ml NP40 bei RT
- 5 min 75µl Hoechst 33342

- Kurz PBS
- Mit Vectashield eindecken  
(kühl und dunkel lagern)

## 9 DANKSAGUNG

Mein Dank geht an **Herrn Prof. Dr. med. Heinz Höfler**, der die Arbeit überhaupt erst ermöglichte und mir die nötigen histologischen Präparate und Daten überließ sowie den nötigen Arbeitsrahmen sicherstellte.

Ein großes Danke gilt **Frau PD Dr. rer. nat. Michaela Aubele**, die mir das Thema zur Verfügung stellte und mich dreieinhalb Jahre mit viel Geduld und Motivation bei der Arbeit unterstützte und betreute, mir vor allem auch bei der Niederschrift dieser Arbeit zur Seite stand und viele Stunden ihrer Zeit zur Verfügung stellte.

**Frau Di Grazia** danke ich für die große Unterstützung und Durchführung der Präparation der histologischen Schnitte für die FISH.

**Herrn Herbert Braselmann** gilt der Dank für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Berechnungen.

**Herrn Hutzler** ein Dankeschön für die Einführung in die Handhabung und Betreuung der benötigten Mikroskope.

Allen Korrekturlesern sei auch noch ausdrücklich gedankt.

Und nicht zuletzt ein riesengroßes, ganz herzliches Danke an meine Familie und meine Freunde, ohne die ich es nie soweit geschafft hätte.

## 10 LEBENSLAUF

**Geburtstag und – ort** 26.06.1982 in München

### **Schulbildung**

---

09/1992 – 07/1998 St. Anna Gymnasium München

09/1998 – 06/1999 Whitehall Highschool, Whitehall, USA

09/1999 – 06/2002 Lion Feuchtwanger Gymnasium München, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### **Hochschulstudium**

---

10/2002 – 09/2004 Medizinstudium Ludwig-Maximilians-Universität München

September 2004 Physikum, Note: 2,6

10/2004 – 04/2009 Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Technischen Universität München

April 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0

### **Berufstätigkeit**

---

Seit 01.06.2009 Assistenzärztin in der chirurgischen Klinik des Spitals Zollikerberg, Zürich, Schweiz