

Prognostische Bedeutung von
HER-2/*neu* Gen-Amplifikation mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung und
HER-2/*neu* Protein-Überexpression mittels Immunhistochemie sowie uPA und PAI-1
beim nodal-negativen Mammakarzinom

Suna Yurdseven

2001

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität Klinikum München rechts der Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Prognostische Bedeutung von
HER-2/*neu* Gen-Amplifikation mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung und
HER-2/*neu* Protein-Überexpression mittels Immunhistochemie sowie uPA und PAI-1
beim nodal-negativen Mammakarzinom**

Suna Yurdseven

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. Privatdozentin Dr. N. Harbeck
 2. Univ.-Prof. Dr. M. Werner (schriftliche Beurteilung)
 2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 26.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 14.11.2001 angenommen.

Meinen Eltern, beiden Schwestern
&
Dr. med. igdem Hilderscheid

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	DEFINITION DES MAMMAKARZINOMS	7
1.2	EPIDEMIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS.....	7
1.3	PROGNOSEFAKTOREN BEIM MAMMAKARZINOM	10
1.3.1	<i>Etablierte Prognosefaktoren</i>	<i>10</i>
1.3.2	<i>HER-2/neu.....</i>	<i>12</i>
1.3.3	<i>uPA und PAI-1</i>	<i>17</i>
2	ZIELSETZUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	PATIENTINNENGUT	23
3.2	MATERIAL UND METHODEN	25
3.2.1	<i>Bestimmung der HER-2/neu Gen-Amplifikation mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)</i>	<i>25</i>
3.2.2	<i>Immunhistochemische Bestimmung der HER-2/neu Protein-Überexpression..</i>	<i>27</i>
3.2.3	<i>Biochemische Bestimmung von uPA und PAI-1.....</i>	<i>30</i>
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	TRADITIONELLE UND TUMORBIOLOGISCHE FAKTOREN	32
4.2	HER-2/NEU GEN-AMPLIFIKATION UND HER-2/NEU PROTEIN-ÜBEREXPRESSION	32
4.3	KORRELATION ZWISCHEN PROGNOSEFAKTOREN UND KRANKHEITSVERLAUF	32
4.3.1	<i>Univarianzanalysen.....</i>	<i>33</i>
4.3.2	<i>Multivarianzanalysen.....</i>	<i>33</i>
5	DISKUSSION	45
5.1	METHODEN DER HER-2/NEU BESTIMMUNG	45
5.2	KLINISCHE BEDEUTUNG DER HER-2/NEU BESTIMMUNG.....	47
6	ZUSAMMENFASSUNG	51

7	LITERATURVERZEICHNIS	52
8	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	61
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	61
8.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	63
9	DANKSAGUNG	64
10	LEBENS LAUF	65

Abkürzungsverzeichnis

CART	„Classification and Regression Tree“ Analyse
DFS	Rezidivfreie Überlebenszeit (disease-free survival)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
HER-2/<i>neu</i> AMP	HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation
HER-2/<i>neu</i> EXP	HER-2/ <i>neu</i> Protein-Überexpression
HER-2/<i>neu</i>	HER-2/ <i>neu</i> (=c-erbB-2) Onkogen
IHC	Immunhistochemie
OS	Gesamtüberlebenszeit (overall survival)
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1
PR	Progesteronrezeptor
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (=Urokinase)
uPA-R	Urokinase-Rezeptor (CD 87)

1 Einleitung

1.1 Definition des Mammakarzinoms

Unter dem Sammelbegriff **Mammakarzinome** werden diejenigen malignen Tumoren der Brust zusammengefasst, die von den Epithelien mit Merkmalen von Milchgängen (duktales Karzinom) oder von lobulären Drüsenendstücken (lobuläres Karzinom) ausgehen (*Riede, 1995*).

Man unterscheidet zwischen einem intraduktalen Karzinom und einem invasiven duktalem Karzinom bzw. zwischen einem lobulären Carcinoma In Situ und einem invasiven lobulären Karzinom, wobei die invasiven Formen einen hohen Malignitätsgrad aufweisen. Es gibt eine Reihe von Mammakarzinomen, die als „Sonderformen“ bezeichnet werden, seltener vorkommen und eine bessere Prognose als die invasiven Karzinome aufweisen. Zu diesen zählt man folgende Formen: tubuläre, papilläre, muzinöse, medulläre Karzinome u.a. Das invasive duktales Karzinom ist mit 65-80% der häufigste Karzinom-Typ der Brustdrüse. Es ist definiert als ein Tumor, der nicht in eine der anderen Kategorien passt und deshalb als „not otherwise specified (NOS)“ bezeichnet wird (*Tumorzentrum München, 1998*).

1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

In den westlichen Ländern ist das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Nach heutigen Inzidenzzahlen erkranken ca. **8-9%** der Frauen am Mammakarzinom (*Tumorzentrum München, 1998*).

Das Mammakarzinom kommt bei beiden Geschlechtern vor, aber die Inzidenz beim Mann ist um ein 100faches geringer als bei der Frau. Epidemiologische Studien zeigten, dass die Inzidenz des Mammakarzinoms mit einem Häufungsmaximum in den USA und einem Minimum in Japan eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweist. Anfangs vermutete man, dass genetische Unterschiede zwischen diesen beiden Rassen eine mögliche Erklärung darstellen könnten. Diese Vermutung wurde jedoch durch Studien über Nachkommen von Einwanderern in den USA, die aus Japan kamen, nicht bestätigt. Diese

Studien wiesen daraufhin, dass Umweltfaktoren eine grosse Rolle in der Entwicklung eines Mammakarzinoms spielen.

Ein **erhöhtes Risiko** für die Entwicklung von Mammakarzinom haben folgende Frauen:

1. BRCA-1 (breast cancer gene)-Mutationsträgerinnen
2. Behandeltes Mammakarzinom der kontralateralen Seite
3. Familiäre Belastung
4. Atypische duktale/lobuläre Hyperplasie (Mastopathie Grad III nach Prechtel)
5. Malignom in der Eigenanamnese
6. Deutliches Übergewicht
7. Nullipara, späte Erstgebärende (>35J)
8. Frühe Menarche (<12J), späte Menopause (>52J)
9. Alter über 50 Jahre

Liegen 1-3 der genannten Risikofaktoren vor (ausser BRCA-1), ist mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko zu rechnen (*Tumorzentrum München, 1998*). Epidemiologische Risikofaktoren sind Bedingungen, die in Bevölkerungsstudien bei der Untersuchung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen als krankheitsfördernde Umstände statistisch gesichert wurden. Sie können uns lediglich Auskunft darüber geben, ob ein erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken vorliegt. Aber nachdem die Diagnose Mammakarzinom gesichert wurde, rücken andere Probleme in den Vordergrund: Man muss sich überlegen, welche OP-Methode angewandt werden soll; ob eine Bestrahlung und bzw. oder eine adjuvante systemische Therapie notwendig ist. Einen weiteren wichtigen Punkt stellt die Abwägung zwischen dem tatsächlichen Nutzen und den nicht zu unterschätzenden Begleiterscheinungen einzelner Therapieschemata, die sich in Form von gravierenden Nebenwirkungen sowie sozialen und psychischen Belastungen zeigen, dar (*Goldhirsch et al., 1989*).

Die starke Heterogenität der Mammakarzinom-Erkrankung und die dadurch bedingte extreme Variabilität einzelner Krankheitsverläufe erschwert die Einschätzung des individuellen Risikos einer Patientin in Hinblick auf eine frühe systemische Ausbreitung des Karzinoms. Direkte bildgebenden Verfahren, wie Ultraschall, Röntgen oder Skelettszintigramm geben erst zu einem relativ späten Zeitpunkt einen Hinweis auf Generalisierung. Ausserdem kann die Variabilität teilweise durch die biologischen Eigenschaften des Tumors erklärt werden (*Clark, 1996*). Deshalb versucht man durch Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren Anhaltspunkt zu gewinnen, um das Patientenkollektiv genauer zu charakterisieren, das von adjuvanten systemischen Therapiemassnahmen profitieren würde. Erst dadurch könnte es möglich sein

die Anzahl derjenigen Patientinnen drastisch zu verringern, die die Nebenwirkungen in Kauf nehmen müssen ohne letztlich von solchen Therapiemassnahmen zu profitieren.

Mammakarzinompatientinnen, deren Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärtherapie keine Tumorzellen aufweisen, sind für Ärzte, die sich in der Behandlung des primären Mammakarzinoms spezialisieren, von grossem klinischen Interesse. Basierend auf historischen Daten sind zwei Drittel der nodal-negativen Patientinnen durch eine alleinige loko-regionale Therapie geheilt, so dass keine adjuvante systemische Therapie mehr notwendig ist. Nur ein Drittel aller nodal-negativen Patientinnen erleben das Wiederauftreten ihrer Krankheit innerhalb von zehn Jahren ab ihrer ersten Operation und sterben schliesslich an Metastasen (*Clark und McGuire, 1988*).

Bis jetzt wurden **traditionelle histomorphologische** und **klinische Faktoren wie Tumogrösse, Grading, Steroidhormonrezeptorstatus, Alter** oder **Menopausenstatus** benutzt, um diejenigen nodal-negative Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko, die von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren würden, zu identifizieren (*McGuire and Clark, 1992*). Wenn aber diese traditionellen prognostischen Faktoren benutzt werden, würden bis zu 95% (*Zujewski et al., 1998*) aller nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen eine adjuvante systemische Therapie erhalten, obwohl nicht mehr als ein Drittel dieser Patientinnen Metastasen entwickeln werden. Diese Diskrepanz regte die Suche nach tumorbiologischen prognostischen Faktoren an, um die Identifizierung, der mit einem erhöhten Rezidivrisiko behafteten nodal-negative Patientinnen, zu verbessern.

1.3 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

1.3.1 Etablierte Prognosefaktoren

Ein Prognosefaktor ist definiert als ein zum Zeitpunkt der Diagnose und Operation verfügbares Mass und steht in Beziehung mit der rezidivfreien (DFS) bzw. der Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abwesenheit einer adjuvanten systemischen Therapie (*Clark, 1996*).

Als **klinisch akzeptierte Prognosekriterien** beim **Mammakarzinom** gelten der **axilläre Lymphknotenstatus**, die **Grösse des Primärtumors**, der **Hormonrezeptorstatus**, die **histopathologische Klassifikation** des Tumors, sowie **Menopausenalter** und **Alter** der Patientin.

In den letzten Jahren wurden Faktoren des Tumorgewebes entdeckt, die die Malignität und Aggressivität von Krebszellen entscheidend beeinflussen. Die Faktoren bestimmen beispielsweise die Fähigkeit von Krebszellen, aus dem Tumorgewebe auszubrechen (**Proteolyse, Invasion**), in eine bestimmte Richtung zu wandern (**Adhäsion, Migration**), über Gefässe in gesundes Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden (**Metastasierung**). Der Gehalt des Tumorgewebes an diesen Faktoren lässt oft mit einer grossen Wahrscheinlichkeit vorhersagen, ob es im gegebenen Fall zum Wiederauftreten der Erkrankung in der Zukunft kommen wird.

Nicht allein das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung, sondern auch die Biologie des Tumors bestimmen die Chancen und die Risiken bei einer Krebserkrankung. Die Tumorbiologie beschreibt die Fähigkeit und Mechanismen, die ein Tumor besitzt, um in einem Wirtsorganismus zu wachsen und zu metastasieren.

In **Tabelle 1** werden eine Reihe neuer Prognosefaktoren, die morphologische, zellkinetische und tumorbiologische Aspekte berücksichtigen, den bekannten alten Faktoren gegenübergestellt. Über diese Prognosefaktoren, von denen bereits mehr als 100 bekannt sind, sollte es möglich werden, Vorhersagen über das Risiko des Lokalrezidivs und der Fernmetastasen bzw. das Überleben zu machen und somit Risikopatientinnen zu identifizieren. Dadurch kann eine entsprechende individuelle risikoadaptierte Selektion von Patientinnen für eine adjuvante Therapie erreicht werden (*Tumorzentrum München, 1998*).

Tabelle 1: Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom (*Tumorzentrum München, 1998*)

„Klassische“ und neuere Prognosefaktoren mit gesicherter oder fraglichen klinischer Relevanz	
<p>Klassische Prognosefaktoren</p> <p>TNM-Status Tumorgrösse axillärer Lymphknotenbefall Fernmetastasierung</p> <p>Morphologie Grading (GI-III) vaskuläre Invasion Lymphangiosis carcinomatosa</p> <p>Steroidhormonrezeptoren Östrogenrezeptoren (ER) Progesteronrezeptoren (PR)</p> <p>Menopausenalter</p>	<p>Neuere Prognosefaktoren (Beispiele)</p> <p>Tumorzellnachweis im Knochenmark</p> <p>Proliferation und DNS-Ploidie Thymidin-Labeling-Index (TLI) S-Phase-Fraktion (SPF) DNS-Ploidie Ki-67 (MIB1), PCNA</p> <p>EGF-Rezeptor (EGFR; c-erbB-1)</p> <p>c-erbB-2(HER-2/neu)-Onkogen P-185 Onkogenprodukt andere Onkogene/Wachstumsfaktoren: c-erbB-3, c-myc, TGF-alpha, TGF-beta, p53, Retinoblastom(Rb)-Genprodukt</p> <p>tumorassoziierte Proteasen Urokinase Plasminogenaktivator (uPA) Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) Kathepsin D</p>

Eine weitere wichtige Frage ist, ob durch dies Prognosefaktoren therapeutische Entscheidungen beeinflusst werden. Schliesslich ist zu bedenken, dass für die klinische Praxis die Berücksichtigung nicht relevanter Prognosefaktoren zu einer Verunsicherung der betroffenen Patientinnen führen kann und das Gesundheitswesen dadurch mit weiteren unnötigen Kosten belasten würde (*Ergebnisse einer Konsensuskonferenz, 1997*).

In der heutigen Zeit sind Prognosefaktoren in mindestens drei klinischen Situationen wichtig:

1. Identifizierung der Patientinnen, deren Prognose nach der Operation so gut ist, dass eine zusätzliche adjuvante systemische Therapie keine weiteren Vorteile bringen würde.
2. Identifizierung der Patientinnen, deren Prognose mit der gewöhnlichen Behandlung so schlecht ist, so dass andere, aggressivere Therapieformen notwendig wären.
3. Hinweise auf die Patientinnen, für welche eine spezifische Therapie entweder Vorteile oder auch keine Vorteile mit sich bringen würde (*Clark, 1994*).

Clark weist daraufhin, dass man vorsichtig sein muss, wenn man Ergebnisse veröffentlichter Studien, die potentielle prognostische und prädiktive Faktoren beurteilen, interpretiert. Er rät sich an die Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren modifiziert nach *Mc Guire* zu halten (**siehe Tabelle 2**).

Tabelle 2: Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren (modifiziert nach *McGuire, 1991 und Graeff, 1997*)

1. Biologische Hypothese
2. Einfacher Nachweis für den Faktor
3. Biostatischer Planung der Durchführung
4. Korrelation mit etablierten Faktoren
5. Optimierte Schwellenwerte zur Untersuchung in Niedrig- und Hochrisikogruppen
6. Univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung von Faktoren)
7. Validierung der Ergebnisse in einem anderen Patientenkollektiv durch andere Untersucher
8. Klinische Studie, Auswirkung auf die Therapie
9. Überführung in die klinische Praxis

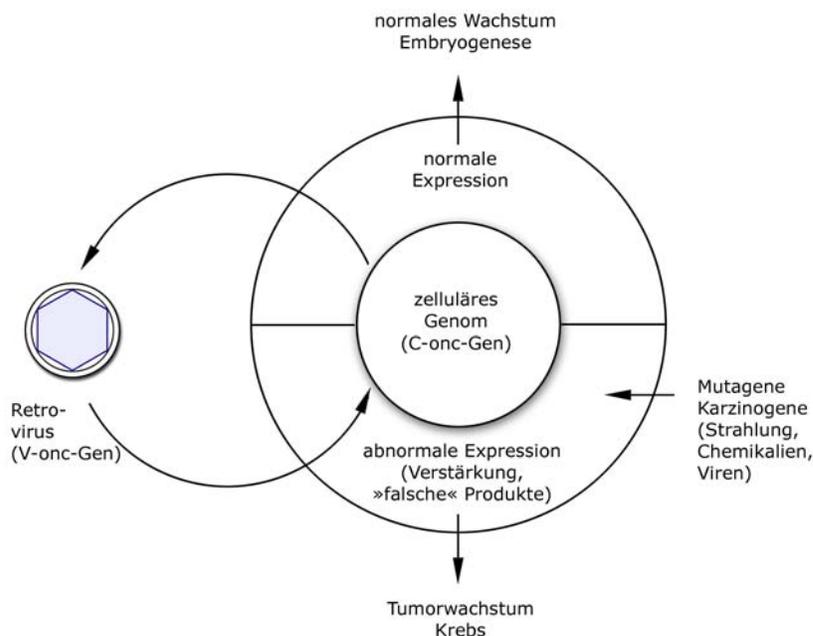
1.3.2 HER-2/neu

Einer der tumorbiologischen Faktoren, der als Marker einer schlechten Prognose bei Mammakarzinompatientinnen gilt, ist das Proto-Onkogen **HER-2/neu Gen** (c-erbB-2) (*Slamon et al., 1987a; O`Reilly et al., 1991*).

Onkogene sind Gene mit onkogener Potenz, die mit verschiedenen Tumoren assoziiert sind und sich von sogenannten Proto-Onkogenen ableiten. Proto-Onkogene sind durch ihre Genprodukte an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse (insbesondere der Zellproliferation) beteiligt. Sie haben frühembryonal besondere

Kontrollaufgaben, z.B. in Trophoblastzellen der Plazenta für die endokrine und immunologische Umstellung des mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft. Die Wirkung der Proto-Onkogene wird durch Tumorsuppressorgene (anti-Onkogene) kontrolliert. Proto-Onkogene liegen in inaktiver Form in jeder somatischen Zelle vor und müssen für die Entstehung eines Tumors zunächst in Onkogene umgewandelt werden. Es existieren verschiedene Theorien, die diesen Vorgang zu erläutern versuchen: Die onkologische Gegenregulationstheorie erklärt die Umwandlung der Proto-Onkogene in Onkogene durch eine Veränderung der Regulationsmechanismen zwischen den Operator- und Regulator-Genen. Nach der Mutationstheorie ist die Onkogenentstehung Folge direkter Veränderungen am Operator-Gen. Nach der Onkogenhypothese kann die in den Zellen vorhandene Information, die deren maligne Entartung bewirken kann, durch onkogene Viren und anderen Kanzerogene, aber auch durch verschiedene endogene Faktoren (z.B. Altern, Hormone) sowie den Verlust von Tumorsuppressorgenen reaktiviert werden. Man muss hervorheben, dass die Mehrzahl der bekannten Onkogene von Viren abstammt und nur ein geringer Teil bisher noch nicht in Viren nachgewiesen wurde (*Pschyrembel, 1998; Tumorzentrum München, 1998*).

Abbildung 1: Übergang normaler Zellen in Tumorzellen (*Roche Lexikon Medizin*)



Zusammenfassend kann man sagen, dass es verschiedene molekularbiologische Vorgänge gibt, die eine Onkogen-Aktivierung auslösen: die Translokation mit oder ohne Gen-Rearrangement, die Punktmutation, die Promotor-Insertion von integrierten Retroviren, die Inaktivierung von Suppressor-Genen und die Amplifikation. Die **Amplifikation** ist eine Verdopplung oder weitere Multiplikation der Genkopien, die zu einer vermehrten Onkogen-Aktivität in den Tochterzellen führt (*Tumorzentrum München, 1998*). Jedes Onkogen kodiert für ein Onkogen-Produkt, das Onko-Protein. Diese Proteine sind vor allem Enzyme oder Wachstumsfaktoren bzw. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren.

Fünf Onkogene werden häufig, aber nicht nur beim Mammakarzinom gefunden: c-myc, c-erbB-1, c-erbB-2, c-int2, c-mam (*Tumorzentrum München, 1998*).

Das c-erbB-2 (**HER-2/neu**)-Onkogen gehört zu der cerb-Onkogen-Familie. Sie beinhaltet 4 Subtypen (**Tabelle 3**): EGFR oder HER-1 (erbB-1), HER-2 (erbB-2), HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4) (*Lupu et al., 1991*). Das Akronym „**neu**“ leitet sich vom Neuroglioblastom der Ratte ab. „**HER**“ leitet sich ab von „Human Epidermal growth factor Rezeptor“ (*Tumorzentrum München, 1996*).

Das Onkogen c-erbB-1 codiert einen Rezeptor (EGFR) für den Epidermalen Wachstumsfaktor. Das Onko-Protein des c-erbB-2-Gens ist ein transmembranöser Phosphoglykoprotein-ähnlicher Rezeptor (P185/ HER-2) mit Tyrosinkinaseaktivität und einer atomaren Masseneinheit von 185.000 Dalton (*Slamon et al., 1987b*). Die Produkte der Onkogene c-erbB-1 und c-erbB-2 weisen eine starke Homologie auf, obwohl sie auf verschiedenen Chromosomen liegen, ihre biochemische Zusammensetzung und ihr Molekulargewicht unterschiedlich sind (**Tabelle 4**) (*Tumorzentrum München, 1998; Slamon 1988; De Potter, 1994*). Die c-erbB-3 und c-erbB-4-Onkogene weisen ebenfalls eine grosse Homologie zu den beiden anderen Mitgliedern der Tyrosinkinase-Familie auf (*Beckmann et al., 1993*) und scheinen eine zentrale Rolle in der Wachstumsregulation und Differenzierung des Karzinoms zu spielen (*Loaiciga et al., 1994*).

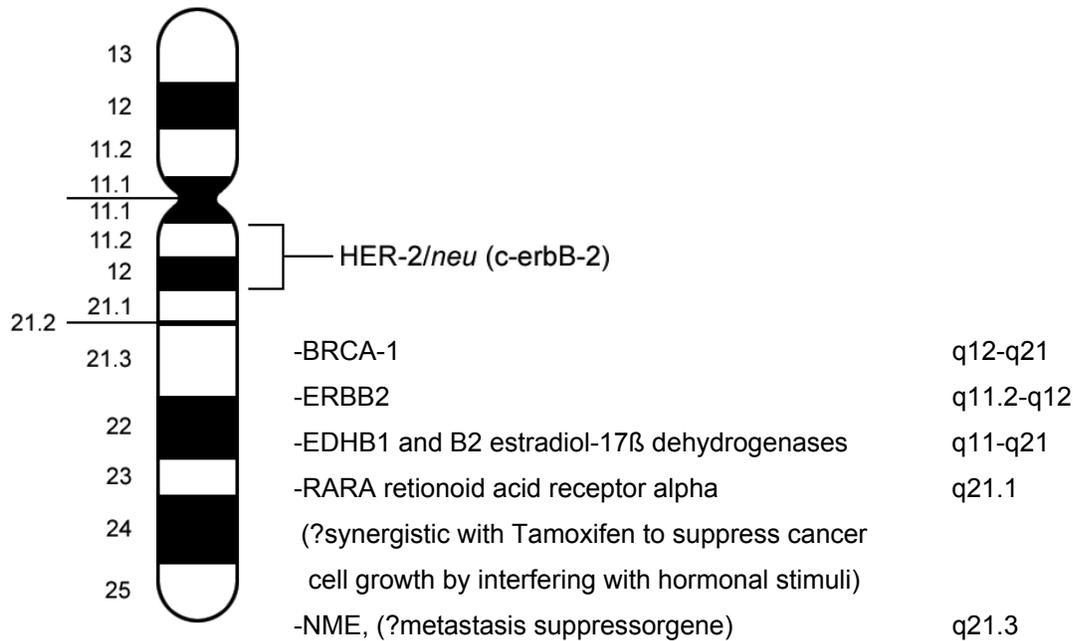
Tabelle 3: Die *cerb*-Onkogen-Familie (*Ross et al., 1998*)

Onkogen-Subtyp	Rezeptor	Ligand
c-erbB-1 (HER-1)	EGFR (170 kD)	EGF TGF- α (Transforming growth factor-alpha) Beta Cellulin Heparin binding growth factor Amphiregulin
c-erbB-2 (HER-2)	<i>neu</i> -Protein (185 kD)	? (Heregulin)
c-erbB-3 (HER-3)	c-ERB-B3	Heregulin <i>Neu</i> differentiation factor 1+2
c-erbB-4 (HER-4)	c-ERB-B4 (HER-4)	Heregulin <i>Neu</i> differentiation factor 1+2

Tabelle 4: Unterschiede zwischen dem HER-2/*neu*-Gen und dem EGFR-Gen

	HER-2/<i>neu</i> Gen	EGFR-Gen
Chromosom	17 Bande q21	7 Bande p11- p13
mRNA	4,8 kB	5,8 & 10 kB
atomare Masseneinheit	185 kD	170 kD

Das HER-2/*neu* Onkogen ist auf dem Chromosomen 17q, in einer Region in der mehrere für Mammakarzinom relevante Gene wie z.B. BRCA-1, Östradiol-17 β -Dehydrogenase, NMR3, RARA sind, lokalisiert (*Human Gene Mapping 11, 1991*) (**Abbildung 2**).

Abbildung 2: Chromosom 17q (*Human Gene Mapping 11, 1991*)

Anomalien dieses Gens wie z.B. DNA-Amplifikationen können mittels der FISH-Methode bzw. der Southern Blot-Analyse entdeckt werden, wohingegen die Protein-Überexpression mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) bzw. dem Western Blot dargestellt werden kann. 95% der HER-2/*neu* Protein-Überexpressionen können mit einer HER-2/*neu* Gen-Amplifikation in Verbindung gebracht werden (*Ross JS: persönliche Mitteilung, 1998*).

Das HER-2/*neu* Protein wurde in gutartigen Brustläsionen, in nicht-invasiven duktalem Karzinomen und in invasiven Brustkarzinomen entdeckt (*Pavelic et al., 1992; Kalogeraki et al., 1996*). Bei einer fast 100 Studien mit mehr als 20000 Patientinnen zusammenfassenden Arbeit berechneten *Revillon et al. (1998)* in Mammakarzinomgewebe eine mittlere HER-2/*neu* Positivität von 26% (5-55%), unabhängig von der Bestimmungsmethode.

Die Aktivierung des **HER-2/*neu*** Proto-Onkogens wird durch eine **Gen-Amplifikation (AMP)** verursacht und führt zu einer **Protein-Überexpression (EXP)**. Techniken, die benutzt werden, um die HER-2/*neu* Anomalie beim Mammakarzinom darzustellen, beinhalten molekularbiologische Methoden wie Southern und Slot Blotting, Methoden der

Polymerasekettenreaktion (PCR) und die in Situ Hybridisierung, sowohl fluoreszierende (FISH) als auch nicht fluoreszierende Techniken (Ross *et al.*, 1998). Das HER-2/*neu* Protein wird mittels Immunhistochemie (IHC) an Kryogewebe und an formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebe bestimmt oder mittels Western Blotting und Enzym-Immunassay (ELISA) quantifiziert (Ross *et al.*, 1998). Aufgrund dieser unterschiedlichen Methoden steht die prognostische Information des HER-2/*neu* Status beim primären Mammakarzinom immer noch zur Diskussion. Während in zahlreichen Studien über den prognostische Wert der HER-2/*neu* Positivität bei nodal-positivem Mammakarzinom berichtet wird, steht die prognostische Bedeutung bei nodal-negativem Mammakarzinom immer noch zur Bewertung (Revillon *et al.*, 1998).

Zwei grosse Studien zeigten eine signifikante prognostische Bedeutung der HER-2/*neu* DNA-Amplifikation beim nodal-negativen Mammakarzinom (Press *et al.*, 1997; Andrulis *et al.*, 1998). Während Andrulis *et al.* die PCR, Southern und Slot Blot anwandte, um die HER-2/*neu* Amplifikation darzustellen, benutzten Press *et al.* (1997) die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH), welche ihrer Meinung nach im Vergleich zur konventionellen Southern Blot Analyse einige methodische Vorteile bietet. HER-2/*neu* wurde ausserdem als prädiktiver Faktor des Ansprechens auf eine endokrine oder zytotoxisch systemische Therapie beschrieben (Allred *et al.*, 1992; Klijn *et al.*, 1993; Muss *et al.*, 1994; Carlomagno *et al.*, 1996; Makris *et al.*, 1997).

1.3.3 uPA und PAI-1

Mehrere unabhängige Erforschungen ergaben, dass sowohl beim nodal-positiven als auch beim nodal-negativen Mammakarzinom die zwei Marker, **Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)** und sein Inhibitor, der **Plasminogen-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)**, einen starken prognostischen Einfluss auf die Rezidiventwicklung und Metastasierung zeigen. Erhöhte Antigen-Werte des uPA und/oder des PAI-1, die mittels ELISA in frischen Tumorproben bestimmt wurden, wurden mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Duffy *et al.*, 1990; Jänicke *et al.*, 1993; Grohndahl-Hansen *et al.*, 1993; Bouchet *et al.*, 1994; Foekens *et al.*, 1994; Fernö *et al.*, 1996; Knoop *et al.*, 1998; Kute *et al.*, 1998; Harbeck *et al.*, 1999). Die Beifügung sowohl der uPA als auch der PAI-1 Messungen zum

Routinepanel für prognostische Faktoren beim Mammakarzinom wurde von der EORTC Rezeptor und Biomarker Study Group (*Blankenstein et al., 1997*) empfohlen.

Das maligne Potential eines soliden Tumors besteht in seinen Fähigkeiten der schnellen Proliferation einerseits und der Invasion und Metastasierung andererseits.

Während der Metastasierung durchläuft die Krebszelle folgende verschiedene Schritte: Abtrennung der Krebszelle von ihrem Primärtumor; Migration der Krebszelle; Eindringen der Krebszelle in das umliegende Gewebe, wobei eine Adhäsion an Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) und anschliessend ein Abbau notwendig sind; Invasion der Blut- und Lymphgefässe; Adhäsion an und Penetration durch das Endothel ermöglicht eine Kolonisation an fernen Punkten des Organismus (*Liotta et al., 1991; van Roy und Märeel, 1992; Behrens, 1993*).

Heutzutage steht es fest, dass proteolytische Enzyme, ihre Rezeptoren und Inhibitoren aktiv am Invasions- und Metastasierungsprozess der Tumorzellen beteiligt sind (*Schmitt et al., 1992a*).

Eine effiziente fokale Proteolyse, Tumorzellinvasion, Migration und eine nachfolgende Metastasierung basieren auf einem **kritischen Gleichgewicht** zwischen der **Protease uPA**, ihres **Zelloberflächenrezeptors uPA-R** und ihres **Inhibitors PAI-1** (*Liu et al., 1995; Andreasen et al., 1997; Eissa et al., 1997; Bajou et al., 1998*).

Die Plasminogen-Aktivierung wird durch die zwei unterschiedlichen Plasminogen-Aktivatoren, uPA und tPA, katalysiert. Beide sind in der Lage aus dem inaktiven Zymogen Plasminogen die Protease Plasmin zu aktivieren. Während die primäre Rolle des Gewebetyps tPA, das Erzeugen des Plasmins der Thrombolyse dient, führt die Bildung von Plasmin mittels des Plasminogen-Aktivators vom Urokinasetyp uPA bei Tumoren zu einer Zerstörung der Extrazellulären Matrix (ECM) (**Proteolyse**), indem die Proteine Laminin, Fibronectin und Fibrin abgebaut werden (*Dano et al., 1985; Liotta et al., 1991; Pollanen et al., 1991; Mignatti und Rifkin et al., 1991; Duffy, 1993; Schmitt et al., 1997a*) und so letztlich die Metastasierung möglich wird. Ausserdem ist uPA in der Lage, eine Form der Kollagenase IV (*Duffy, 1993*) und bestimmte Wachstumsfaktoren (z.B. Hepatozytenwachstumsfaktor) (*Mars et al., 1993*) zu aktivieren und sowohl die zelluläre Migration (*Odekon et al., 1992*) als auch die Mitose (*Binder, 1990*) zu stimulieren. Die meisten dieser Funktionen, aber nicht alle, finden nach der Bindung der Protease an einen Membran-gebundenen-Rezeptor statt (*Duffy, 1993*). Die Plasminogen-Aktivierung mittels uPA wird durch zwei Inhibitoren, PAI-1 und PAI-2, und

dem Oberflächenzellrezeptor, uPA-R, der sowohl das Pro-uPA als auch das aktive uPA binden kann, reguliert. Während der Bindung an den Rezeptor kann Pro-uPA in uPA umgewandelt werden und das rezeptorgebundene uPA kann Plasminogen aktivieren (*Blasi et al., 1987; Laiho und Keski-Oja, 1989*).

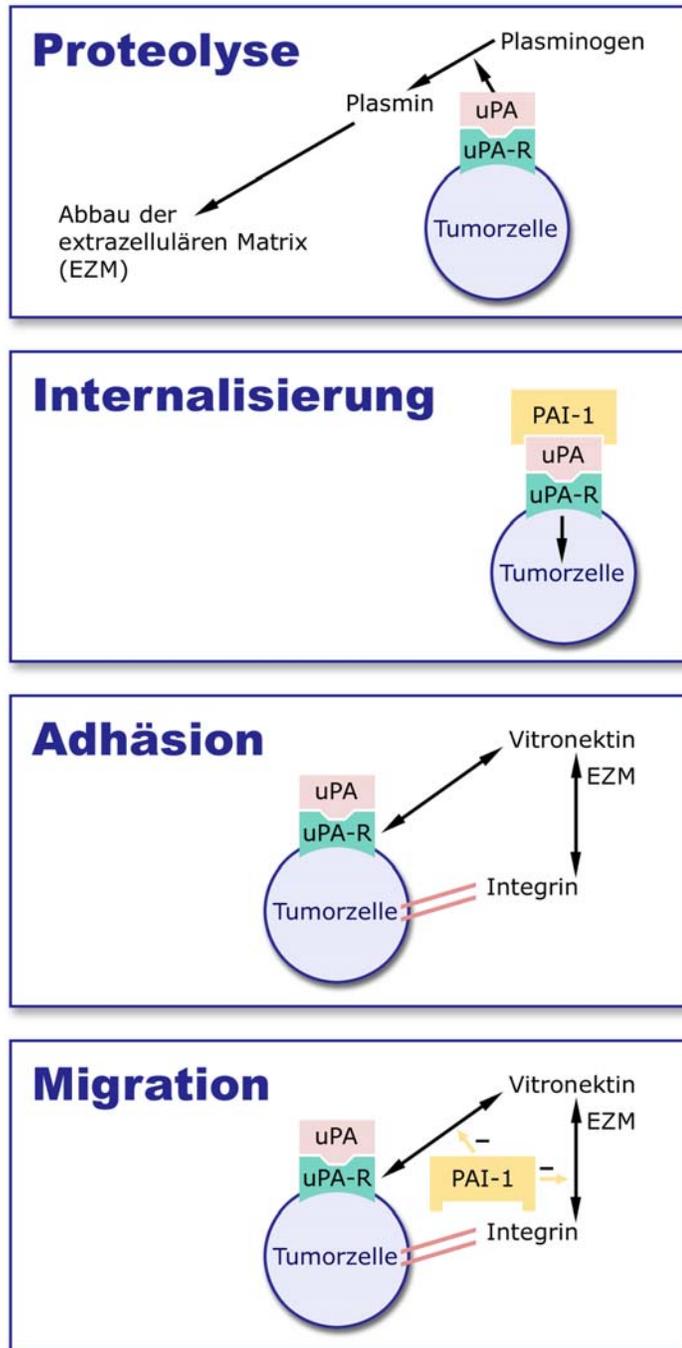
Schon 1947 beschrieben Astrup und Permin eine Plasminogen-Aktivator-Aktivität in Geweben (*Schmitt, 1997a*). Aber erst 1976 fanden Astedt und Holmberg heraus, dass das uPA sowohl in Krebszellen produziert als auch von diesen freigesetzt wird (*Astedt und Holmberg, 1976*). Seit dieser Zeit häuften sich immer mehr Beweise dafür, dass die Anteile des Plasminogen-Aktivierung-Systems an der Proliferation, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen beteiligt sind. *Duffy* und seine Kollegen waren 1988 die Ersten, die zeigten, dass Patientinnen mit einer erhöhten uPA-Aktivität im Mammakarzinom, ein signifikant kürzeres DFS-Intervall aufwiesen als Patientinnen mit geringer uPA-Aktivität im Tumor (*Duffy et al., 1988*). 1989 und 1990 stellten *Jänicke et al.* und *Duffy et al. (1990)* unabhängig voneinander fest, dass das uPA-Antigen ein statistisch signifikanter Prognosefaktor beim primären Mammakarzinom ist. Diese Ergebnisse wurden von vielen anderen Gruppen bestätigt (*Spyratos et al., 1992; Foekens et al., 1992; Grohndahl-Hansen et al., 1993; Fernö et al., 1994*). 1991 berichteten *Jänicke* und Kollegen, dass einer hoher PAI-1-Wert im Primärtumor ebenfalls mit einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom korreliert. Andere Gruppen wie zum Beispiel *Foekens et al. (1994)*, *Duffy (1996)* und *Kute et al. (1998)* konnten dieses Resultat ebenfalls bestätigen. Man fand heraus, dass PAI-1 sowohl bei nodal-negativen als auch bei nodal-positiven Patientinnen mit der Aggressivität der Erkrankung in Verbindung gebracht werden kann. Bei den nodal-negativen Patientinnen war das PAI-1 ein nahezu gleich starker prognostischer Marker wie uPA; in dieser Subgruppe waren die Protease und ihr Inhibitor unabhängig voneinander (*Jänicke et al., 1993*).

Die anfangs unerwartete Beobachtung, dass der hohe Tumorgehalt eines Proteaseinhibitors mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patientinnen einhergeht, wurde in der Zwischenzeit durch neue tumorbiologische Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung verständlich. Die Bindung von PAI-1 an uPA auf dem uPA-Rezeptor (uPA-R) inhibiert die durch uPA begünstigte Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und führt zur **Internalisierung** des uPA-R/uPA/PAI-1 Komplexes, wodurch wiederum intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen ausgelöst werden können. Nach der Internalisierung kann uPA-R wieder an die Zelloberfläche gelangen und dort die invasive Aktivität fokussieren

(*Andreassen et al., 1997*). PAI-1 ist ausserdem in der Lage, die **Adhäsion** der Zelle an Vitronektin, einen Bestandteil der ECM, zu hemmen, indem es die Bindung zwischen Vitronektin und dem Zelloberflächenintegrin $\alpha_v\beta_3$ blockiert (*Stefansson et al., 1996; Wei et al., 1996*). Durch Bindung von uPA an PAI-1 wird dieser Vorgang unterbunden und Zelladhäsion wieder möglich. Dieses Wechselspiel von Anheften und Loslösen befähigt die Zelle zur **Migration** (*Lauffenburger, 1996*). Das Zusammenspiel von uPA, uPA-R und PAI-1 ermöglicht die gerichtete optimale Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (*Schmitt et al., 1997a*). In **Abbildung 3** sind die biologischen Funktionen von uPA und PAI-1 schematisch zusammengefasst.

Laut *Clark (1994)* sollte ein prognostischer Marker nicht nur Information über die Tumoraggressivität liefern, sondern auch über das Ansprechen einer Therapie etwas voraussagen. Ein gutes Beispiel bietet *Jänicke (1994a)*. Er wies daraufhin, dass die Tatsache, dass nur zwei Drittel der hormonrezeptor-positiven Patientinnen auf eine hormonelle Therapie ansprechen, nahe legt, dass eine hohe uPA-Synthese in Mammakarzinomzellen mit der Expression von „nicht funktionierenden“ Hormonrezeptoren vergesellschaftet sein könnte und somit mit einer mangelnden Hormonabhängigkeit. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Patientinnen mit hohen uPA- und/oder PAI-1-Werten ihres Primärtumors, selten auf eine endokrine Therapie ansprechen, falls Metastasen auftreten. Diese Ergebnisse wurden von *Klijn et al. (1993)* bestätigt. In einer ähnlichen Art und Weise scheint auch HER-2/*neu* auf eine Chemotherapieresistenz hinzuweisen (*Allred et al., 1992; Gusterson et al., 1992*).

Abbildung 3: Graphische Darstellung der verschiedenen biologischen Funktionen von uPA und PAI-1 (Harbeck, 1998).



2 Zielsetzung

Prognostische Faktoren sind beim **Mammakarzinom** entscheidend für eine **risikoadaptierte, individualisierte Therapieplanung**. Da **traditionelle Prognosefaktoren (Lymphknotenstatus, Tumorgrösse, Steroidhormonrezeptorstatus, Grading)** Risikopatientinnen nur unzureichend charakterisieren, werden insbesondere bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen **neue tumorbiologische Faktoren** als Selektionskriterien für die Entscheidung zur adjuvanten systemischen Therapie benötigt. Die vorliegende Arbeit vergleicht in einem Kollektiv nodal-negativer Mammakarzinompatientinnen (n=112) folgende Bestimmungsmethoden miteinander: **HER-2/neu Gen-Amplifikation** bestimmt mittels **FISH** und **HER-2/neu Protein-Überexpression** bestimmt mittels **Immunhistochemie**. Ausserdem untersucht sie ihre prognostische Relevanz und bewertet, ob die Kombination der HER-2/neu AMP und/oder der HER-2/neu EXP mit den traditionellen prognostischen Faktoren und den Tumorinvasionsmarkern **uPA** und **PAI-1**, eine klinisch wichtige Information für die Risikogruppeneinschätzung liefert.

3 Material und Methoden

3.1 Patientinnengut

Die traditionellen klinischen und histomorphologischen Prognosefaktoren (Tumogrösse, Steroidhormonrezeptorstatus, histologisches Grading) und die tumorbiologischen Faktoren (HER-2/*neu* AMP, HER-2/*neu* EXP, uPA, PAI-1) wurden im Primärtumorgewebe von **112 nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen** untersucht (**Tabelle 5**). Die Patientinnen erhielten in einem Zeitraum zwischen den Jahren 1987 und 1993 in der Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar entweder eine modifizierte radikale Mastektomie (n=72) oder eine brusterhaltende Operation mit anschliessender Nachbestrahlung des Restdrüsenkörpers (n=40). 87 Patientinnen (78%) erhielten im Anschluss an die Operation keine adjuvante systemische Therapie, 19 Patientinnen erhielten eine adjuvante Hormontherapie und sechs eine adjuvante Chemotherapie. Das mediane Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 59 Jahre (36-82 Jahre). Zum Zeitpunkt der Primärtherapie waren sowohl klinisch als auch radiologisch keine Fernmetastasen nachweisbar. Nachbeobachtungszeit-Daten wurden alle drei bis sechs Monate erhoben. Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patientinnen, die zum Zeitpunkt dieser Analyse noch lebten, betrug 84 Monate (2-130 Monate). Innerhalb dieser Beobachtungszeitraum erlitten 24 Patientinnen (21%) ein Rezidiv und 19 Patientinnen (17%) starben.

Tabelle 5: Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumor-biologischen Faktoren bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom (n=112).

Faktoren	N	(%)
Tumorgröße (cm)	112	
≤ 2	54	(48,2)
> 2 und ≤ 5	58	(51,8)
Steroidhormonrezeptorstatus	112	
positiv	89	(79,5)
negativ	23	(20,5)
Grading (Bloom-Richardson)	111	
G 1/ 2	73	(65,8)
G 3/ 4	38	(34,2)
Menopausenstatus	112	
prä-/ perimenopausal	36	(32,1)
postmenopausal	76	(67,9)
HER-2/neu Gen-Amplifikation (FISH)	103	
nicht amplifiziert	71	(68,9)
amplifiziert	32	(31,1)
HER-2/neu Protein-Überexpression (IHC)	110	
negativ	65	(59,1)
positiv	45	(40,9)
PAI-1	110	
niedrig (≤ 14 ng/ mg Protein)	86	(78,2)
hoch (> 14 ng/ mg Protein)	24	(21,8)
uPA	110	
niedrig (≤ 3 ng/ mg Protein)	70	(63,6)
hoch (> 3 ng/ mg Protein)	40	(36,4)
uPA/PAI-1	110	
uPA und PAI-1 niedrig	58	(52,7)
uPA und/oder PAI-1 hoch	52	(47,3)

3.2 Material und Methoden

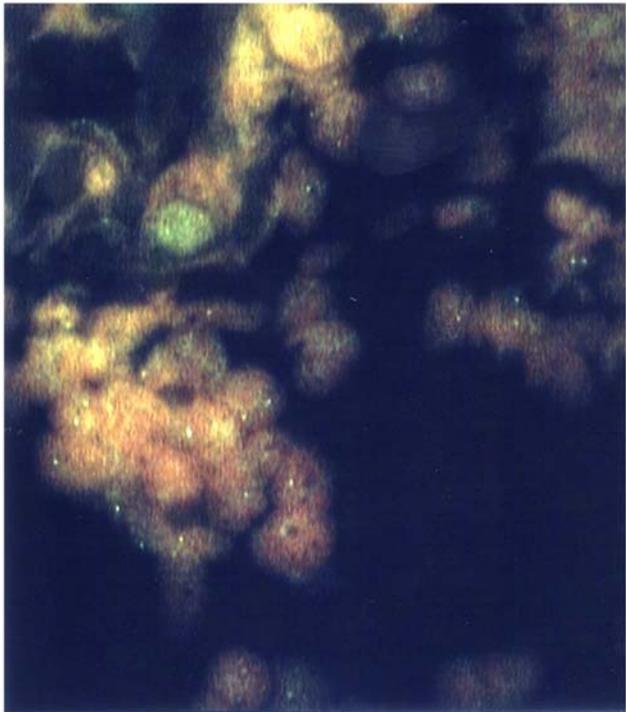
3.2.1 Bestimmung der HER-2/*neu* Gen-Amplifikation mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

Die ungefärbten 4 µm dicken formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorgewebeschnitte wurden auf Plus Objektträger (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) aufgezogen und bearbeitet, indem der Ventana Chromosomen Hybridisierung Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) in dem automatischen in Situ Hybridisierungsgerät Ventana Gen^{II}™ (Ventana Medical Systems) benutzt wurde (**Abbildung 4**). Nach Entparaffinieren mittels Xylol, Dehydrieren mittels 100% Ethanol und Spülen in ddH₂O, wurden die Objektträger in das Ventana Gen^{II} Gerät plaziert. Daraufhin wurden die Objektträger 30 Minuten lang in einer 30% Vorbehandlungslösung bei einer Temperatur von 45°C inkubiert und anschliessend 45 Minuten lang bei 45°C in einer Proteinverdauungslösung bearbeitet (Ventana). Als nächstes wurde die mit der mit der Ventana Digoxigeninsequenz markierte HER-2/*neu*-DNA-Probe für 5 Minuten bei 37°C vorgewärmt, um anschliessend aufgetragen zu werden. Die verwendete Menge dieses Hybridisierungsgemisches entspricht der Zielfläche und dem Deckglasformat, das während der Hybridisierung auf das Gewebestück gelegt wird (10 µl der Probe für eine 22 x 22 mm Gewebstück). Bei 69°C wurde fünf Minuten lang denaturiert, um schliesslich die Schnitte bei 37°C in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer über Nacht mit der Hybridisierungsprobe zu inkubieren. Anschliessend wurden die Präparate dreimal gewaschen. Danach wurde das mit Fluoreszein markierte Antidigoxigenin-Detektions-Reagenz für 28 Minuten bei 37°C aufgetragen. Daraufhin wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und der Überschuss der Detektionsverbindungen in Phosphatpuffer dreimal jeweils 2 Minuten lang gespült. Dann erfolgte die Gegenfärbung mittels 18 µl Propidiumiodid und ein erneutes Abdecken mit einem Deckglas. Die Auswertung der Schnitte nach der Anzahl der HER-2/*neu* Genkopien wurde mit dem Zeiss Axioskop 50 Fluoreszenz Mikroskop (*Carl Zeiss, Thornwood, N.Y.*) bei einer 100fachen Vergrösserung durchgeführt (*Ross et al, 1997; Riben et al, 1997*).

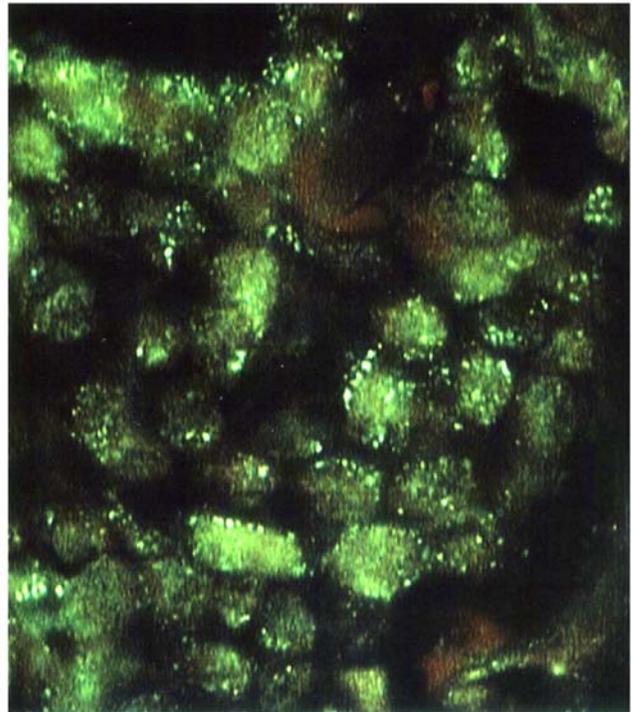
Die Bewertung der Amplifikation wurde folgendermassen durchgeführt: die Probe zeigt einen einzelnen fluoreszierenden Punkt für jeweils eine HER-2/*neu* Genkopie. Die erwartete Anzahl der HER-2/*neu* Genkopie beträgt pro normaler bzw. nicht amplifizierter Tumorzelle zwei,

oder bei sich teilenden Zellen vier. Mindestens 100 Tumorzellen wurden pro Tumorschnitt bewertet. Die Tumoren wurden dann als HER-2/*neu* Gen amplifiziert betrachtet, wenn mindestens 20 Zellen fünf oder mehr Punkte pro Zelle aufwiesen (*Press et al., 1997*).

Abbildung 4: HER-2/*neu* Gen-Amplifikation bestimmt mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) im nodal-negativen Mammakarzinomgewebe.



4a: Nicht-amplifizierter Fall
(2 Kopien pro Zelle)



4b: Amplifizierter Fall
(>20 Kopien pro Zelle)

3.2.2 Immunhistochemische Bestimmung der HER-2/*neu* Protein-Überexpression

Die immunhistochemische Färbungen wurden im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München durch Prof. W. Nathrath und Dr. P. Dettmar durchgeführt. Dabei wurde die Methode, die in der Klinik routinemässig gebraucht wird, angewandt (**Abbildung 5**).

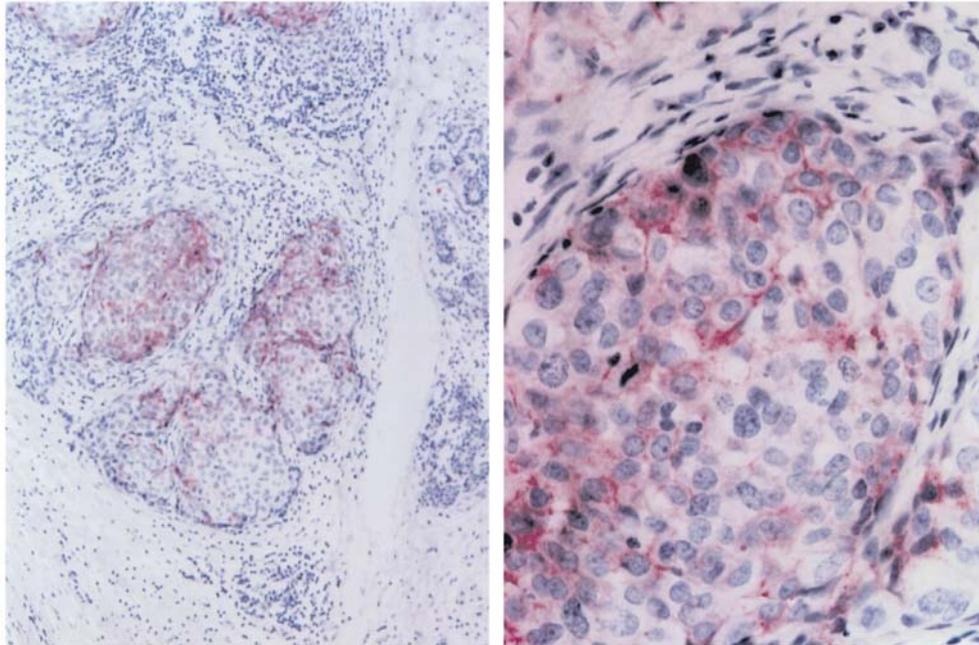
Die immunhistochemische Bestimmung wurde an 4 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Auf einen mit Aminosilan vorbehandelten Objektträger wurden die 4 µm Schnitte aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet. Die Probe wurde daraufhin nachdem sie rehydriert und zweimal mit einer Phosphat-gepufferten Salinlösung (PBS)(=Trispuffer) gespült wurde, mit Saponin (0,005%) (*Sigma, St. Louis, MO*) in ddH₂O bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten vorbehandelt. Einem erneuten Waschen mit Trispuffer folgte die Inkubation (4°C, über Nacht) mit dem monoklonalen Mausantikörper Ab-3 (0,125µg/ml, Oncogene Science, MA) in Trispuffer, dem 1% Rinderserumalbumin (BSA) hinzugefügt wurde (*Sigma*). Nach einer sanften Spülung wurden die Schnitte mit Kaninchen-IgG-anti-Maus-IgG (20µg/ml, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in einem Gemisch Trispuffer zu Humanserum von 5:1 (30 min, RT) inkubiert. Nach einem erneuten Waschen erfolgte die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (Alkaline Phosphatase anti-Alkaline Phosphatase) von Dianova (1:50 in Trispuffer, 30 min, RT). Die Schnitte wurden anschliessend abermals gewaschen und im Anschluss an die Substratfärbereaktion, bei der als Substrat für die Alkalische Phosphatase Texas Fast Red (*Sigma*) verwendet wurde, wurden die Präparate 10 Sekunden lang in Hämalun gegengefärbt und dann mit Deckgläsern versehen. Als negative Kontrolle diente das Weglassen des primären Antikörpers während der Färbeprozedur.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbereaktion erfolgte semiquantitativ durch zwei unabhängige Untersucher (Prof. W. Nathrath und Dr. P. Dettmar). Alle Tumorzellmembranen mit einer über der Hintergrundfärbung liegenden spezifischen Färbereaktion wurden als positiv gewertet. Pro Patientin wurden je Untersucher mindestens 500 zufällig in mehreren Gesichtsfeldern ausgewählte Tumorzellen beurteilt. Abhängig vom histologischen Tumortyp und der daraus resultierenden Tumorzellverteilung wurden die Auswertungen unter dem Mikroskop bei 100- bis 400-facher Vergrösserung durchgeführt.

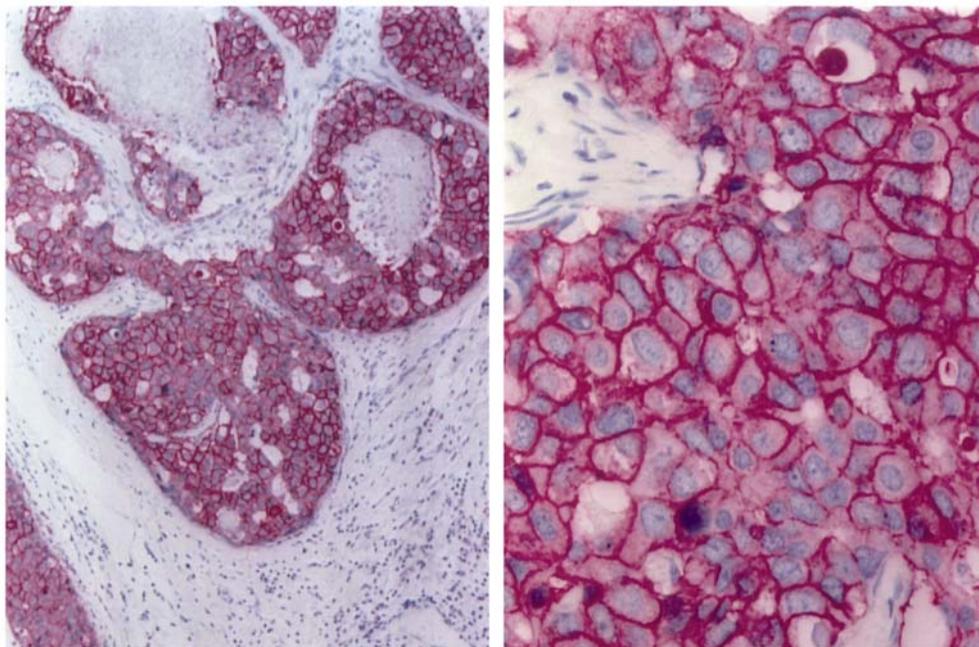
Die HER-2/*neu* Immunreaktivität wurde in Hot Spot Bereichen beurteilt. Die HER-2/*neu* Färbung (HER-2/*neu* EXP) wurde in negativ ($\leq 2,5\%$ der positiven Tumorzellen) und positiv ($> 2,5\%$ der positiven Tumorzellen) eingeteilt.

Abbildung 5: HER-2/*neu* Protein-Überexpression bestimmt mittels der Immunhistochemie durch Anwendung des monoklonalen Mausantikörper Ab-3 (Oncogene Science, MA) im nodal-negativen Mammakarzinomgewebe.

5a: Gering positiver Fall (10% der Tumorzellen weisen klare Membranfärbung für HER-2/*neu* auf). Links: 80fache Vergrößerung; Rechts: 200fache Vergrößerung



5b: Stark positiver Fall (90% der Tumorzellen weisen klare Membranfärbung für HER-2/*neu* auf). Links: 80fache Vergrößerung; Rechts: 200fache Vergrößerung



3.2.3 Biochemische Bestimmung von uPA und PAI-1

Die Antigen-Bestimmung für **uPA** und **PAI-1** wurden mittels kommerziell erhältlichen ELISA-Test in Detergenzextrakten (Triton-X-100) von Mammakarzinomgeweben durchgeführt (uPA: Imubind # 894; PAI-1 Imubind # 821; beide von der American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) (*Jänicke et al, 1990; Jänicke et al, 1994b*). In zwei Fällen war kein frisches Tumorgewebe für die Bestimmung verfügbar. Statistisch optimiert wurden die Schwellenwerte für das uPA (3ng/mg Protein) und PAI-1 (14 ng/mg Protein) festgelegt (*Harbeck et al.,1999; Jänicke et al., 1994a*). Durch die Kombination des uPA und PAI-1 (uPA/PAI-1) wurden die Patientinnen in zwei Kategorien eingeteilt: beide Faktoren mit einem niedrigen Wert im Gegensatz zu hohen Werten entweder eines oder beider Faktoren.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde so durchgeführt wie bei *Jänicke et al. (1993)* und *Schmitt et al. (1997b)* beschrieben: Die Bestimmung der **optimierten Schwellenwerte (cutoff)** für dichotomisierte Variablen zur Unterscheidung zwischen einem Hoch- und einem Niedrigrisikokollektiv wurde mittels Log-rank Statistik durchgeführt (*Jänicke et al, 1993*). Korrelationen zwischen stetigen Variablen, die entsprechenden p-Werte und **Korrelationskoeffizienten** wurden mit dem Spearman Test berechnet. Korrelation zwischen binären Variablen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Die **univariaten Analysen** für rezidivfreie- und Gesamtüberlebenszeit wurde nach Kaplan-Meier durchgeführt (*Kaplan & Meier, 1958*). Die Fünf-Jahres-Rezidivraten wurden den entsprechenden Kaplan-Meier Tabellen entnommen. Die **multivariate Auswertung** erfolgte „forward stepwise“ mittels des „**Cox Proportional Hazards Model**“ (*Cox, 1972*) unter Zuhilfenahme des SPSS Software Pakets (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und mittels der **CART-Technik** (*Breiman et al, 1984*). In die Multivarianzanalysen wurden definitionsgemäss nur diejenigen Patientinnen einbezogen, bei denen alle zu testenden Faktoren bestimmt worden waren. Der Einfluss der adjuvanten Therapie wurde durch Durchführen der Multivarianzanalyse unter Einbeziehen der Variablen „adjuvante Chemotherapie“ und „adjuvante Hormontherapie“ überprüft. Alle Teste wurden auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ mit einem Konfidenzintervall (KI) von 95% durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde am Institut

für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. A. Neiss) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Traditionelle und tumorbiologische Faktoren

In einem Kollektiv mit **112 nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen** wurden die traditionellen histomorphologischen und klinischen Faktoren (Tumorgrösse, Grading, Steroidhormonrezeptorstatus und Menopausenstatus), die Tumorinvasionsmarker (uPA, PAI-1) sowie die *HER-2/neu* Gen-Amplifikation und die *HER-2/neu* Protein-Überexpression bestimmt (**Tabelle 5**) und mit dem Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht.

4.2 *HER-2/neu* Gen-Amplifikation und *HER-2/neu* Protein-Überexpression

In 103 der 112 untersuchten Fälle war ausreichend Gewebe für die Bestimmungen der ***HER-2/neu* Gen-Amplifikation mittels FISH** (Median: 3,3 Genkopien; 2-9,4) verfügbar. In 32 der Mammakarzinome (31% der analysierten Fälle) wurde eine ***HER-2/neu* AMP** festgestellt (**Tabelle 5**). In 110 der 112 untersuchten Fälle war genügend Material für die immunhistochemische Bestimmung der *HER-2/neu* Protein-Überexpression (Median: 0%; 0-90%) verfügbar. In 45 dieser Tumoren (41%) sah man eine *HER-2/neu* EXP (**Tabelle 5**). Eine Übereinstimmung der Ergebnisse sowohl der FISH als auch der IHC wurde in 57 der 102 Fälle (56%), die für die Anwendung beider Methoden zur Verfügung standen, gefunden; 13 dieser 102 Tumoren hatten sowohl eine *HER-2/neu* AMP als auch eine *HER-2/neu* EXP.

4.3 Korrelation zwischen Prognosefaktoren und Krankheitsverlauf

Weder die ***HER-2/neu* AMP** noch die ***HER-2/neu* EXP** waren mit einem der traditionellen prognostischen Faktoren signifikant assoziiert mit der Ausnahme von *HER-2/neu* Gen-Amplifikation und hohem Tumor-Grading ($p=0,049$). uPA und PAI-1-Niveau

korrelierten signifikant miteinander ($p < 0,001$; $r = 0,368$). Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen einem der proteolytischen Faktoren und entweder der HER-2/*neu* AMP oder HER-2/*neu* EXP gefunden.

4.3.1 Univarianzanalysen

In der Univarianzanalyse waren uPA/PAI-1 ($p = 0,002$) (**Abbildung 12**), HER-2/*neu* AMP ($p = 0,010$) (**Abbildung 8a**) und uPA ($p = 0,039$) (**Abbildung 13a**) mit der **rezidivfreien Überlebenszeit (DFS)** assoziiert. HER-2/*neu* EXP (**Abbildung 9a**), PAI-1 (**Abbildung 14a**) und die traditionellen Faktoren (Tumorgröße, Steroidhormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und Grading) wiesen in unserer Patientinnengruppe mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von sieben Jahren keinen signifikanten prognostischen Einfluss auf das DFS auf (**Tabelle 6**).

Bei der Betrachtung der **Gesamtüberlebenszeit (OS)** war die HER-2/*neu* AMP sowohl bei der Univarianz- ($p = 0,001$) (**Abbildung 8b**) als auch bei der Multivarianzanalyse ($p = 0,004$; RR 4,8; 95% KI 1,7-13,9) (**Tabelle 6**) ein statistisch signifikanter unabhängiger prognostischer Faktor. In der Univarianzanalyse waren auch das uPA/PAI-1 ($p = 0,015$) und die HER-2/*neu* EXP ($p = 0,042$) (**Abbildung 9b**) in Bezug auf die OS signifikant, wohingegen die traditionellen Faktoren keinen signifikanten prognostischen Einfluss zeigten (**Tabelle 6**).

4.3.2 Multivarianzanalysen

In der Multivarianzanalyse waren die HER-2/*neu* AMP ($p = 0,027$; Relatives Risiko (RR) 2,7; 95% KI 1,1-6,6) und uPA/PAI-1 ($p = 0,044$; RR 2,7; 95% KI 1,0-7,0), aber nicht die HER-2/*neu* EXP, signifikant mit der rezidivfreien Überlebenszeit (DFS) assoziiert (**Tabelle 6**). Sogar innerhalb der Patientinnen-Subgruppen, die durch die traditionellen prognostischen Faktoren definiert wurden, war die HER-2/*neu* AMP mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert (**Abbildung 10**).

Ein weiteres Multivarianzmodell, die CART-Analyse, wurde angewandt, um die Fähigkeit der etablierten und der tumorbiologischen Faktoren zur Einteilung von Risikogruppen für ein Rezidiv zu beurteilen (**Abbildung 6**). Es zeigte sich, dass die Kombination des uPA und PAI-1 den stärksten Faktor für die Risikogruppeneinteilung ($p = 0,002$) darstellt

(Abbildung 12). Patientinnen mit einem erhöhten Wert eines der beiden proteolytischen Faktoren im Primärtumor wurden zum **Hochrisikokollektiv** (n=52, 18 Rezidive, Rezidivrate 35%) gezählt. Keines der anderen prognostischen Faktoren, auch nicht die HER-2/*neu* AMP, konnten eine signifikant bessere Risikogruppenklassifikation erreichen. Bei den Patientinnen mit sowohl uPA als auch PAI-1 Werten unterhalb des Schwellenwertes, wurden zusätzlich prognostische Informationen mittels der HER-2/*neu* AMP (p=0,023) gewonnen. Die uPA/PAI-1 Niedrigrisikogruppe wurde weiter unterteilt in eine **Niedrigrisikogruppe** mit niedrigen uPA und PAI-1 und keiner HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (39% aller Patientinnen; Rezidivrate 4,6%) und einer Gruppe mit einem erhöhten Risiko, das geringe uPA/PAI-1 Werte und eine HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (n=16; 4 Rezidive) aufweist (**Abbildung 6**). Die Kaplan-Meier Analyse des DFS zeigt ein vergleichbares Ergebnis dieser drei Risikogruppen. Die Kaplan-Meier-Analysen der rezidivfreien- und Gesamtüberlebenszeit sind in den **Abbildungen 11a und 11b** dargestellt.

In der Niedrigrisikogruppe mit niedrigem uPA und PAI-1 und keiner HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (n=44; 2 Rezidive) wurde mittels der CART-Analyse eine andere signifikante Risikogruppeneinteilung beobachtet. Die Patientinnen dieser Gruppe konnten anhand des Gradings weiter eingeteilt werden. Keine der 33 Patientinnen der Niedrigrisikogruppe mit einem gut differenzierten Tumor (G1/G2) hatte zum Zeitpunkt dieser Untersuchung ein Rezidiv (p=0,014) entwickelt (**Abbildung 7**).

Abbildung 6: CART-Analyse für die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom, durchgeführt nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 84 Monaten (uPA, PAI-1, HER-2/*neu* AMP).

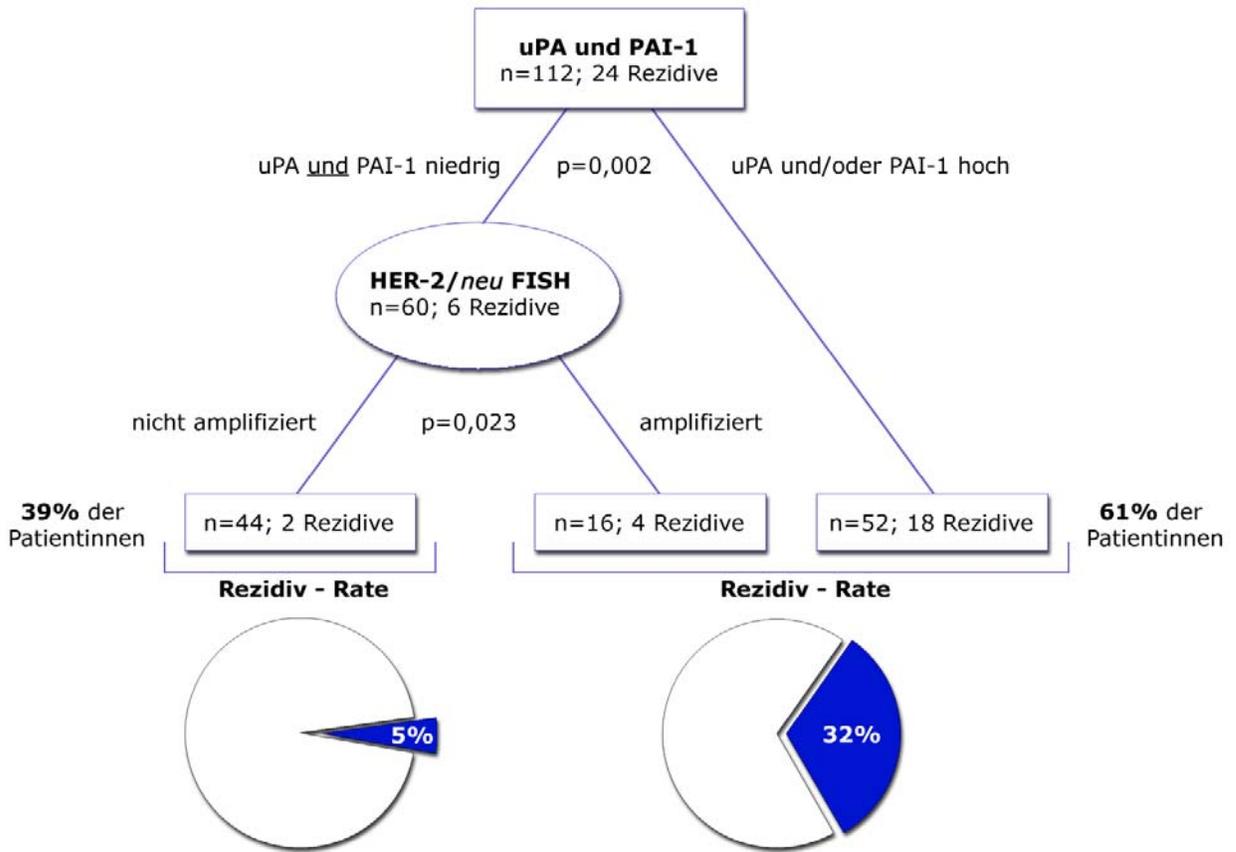


Abbildung 7: CART-Analyse der rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom, durchgeführt nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 84 Monaten (uPA, PAI-1, HER-2/ neu AMP, Grading).

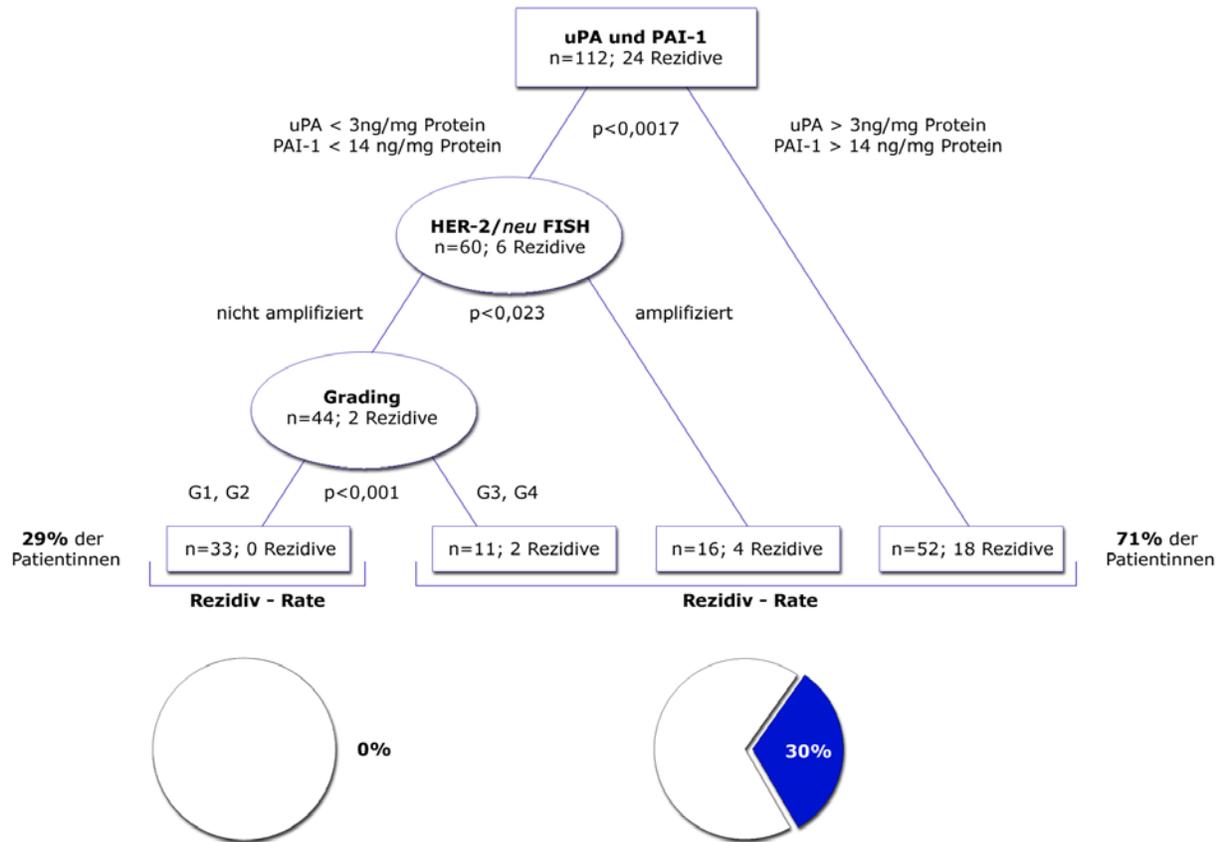


Tabelle 6: Zusammenfassung der univariaten (Kaplan-Meier) und multivariaten Analysen (Cox-Modell) für die rezidivfreie- und die Gesamtüberlebenszeit bei nodal-negativen Patientinnen mit primärem Mammakarzinom.

Prognosefaktoren	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS)			Gesamtüberleben(OS)		
	p-Wert		Relatives Risiko (95% KI)	p-Wert		Relatives Risiko (95% KI)
	univariater	multivariater [§]		univariater	multivariater [§]	
HER-2/ <i>neu</i> AMP	0,010	0,027	2,7 (1,1-6,6)	0,001	0,004	4,8 (1,7-13,9)
uPA/PAI-1	0,002	0,044	2,7 (1,0-7,0)	0,015	n.s. [§]	
HER-2/ <i>neu</i> EXP	n.s. [§]			0,042	n.s	
PAI-1	n.s			0,038	n.s	
uPA	0,039			n.s		
Tumorgrosse	n.s			n.s		
Grading	n.s			n.s		
Hormonrezeptorstatus	n.s			n.s		
Menopausenstatus	n.s			n.s		

[§] Die Multivarianzanalysen wurden bei den 96 Patientinnen durchgeführt, bei denen alle Faktoren bestimmt worden waren. Bei der Anwendung des uPA/PAI-1s als Kombination wurden das uPA und PAI-1 nicht als einzelne Variablen in die Multivarianzanalyse mit einbezogen.

[§] n.s.= nicht signifikant ($p > 0,05$)

Abbildung 8a: Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (FISH) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

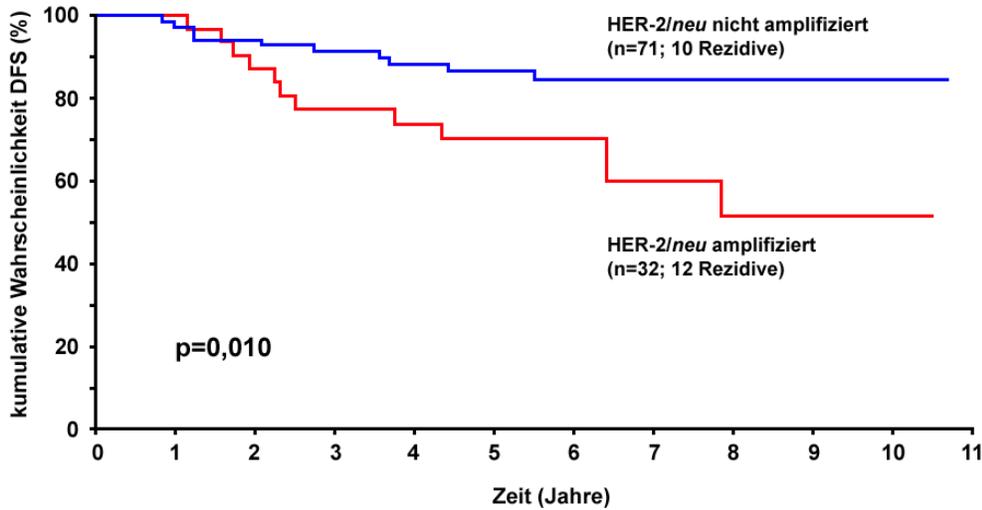


Abbildung 8b: Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (FISH) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

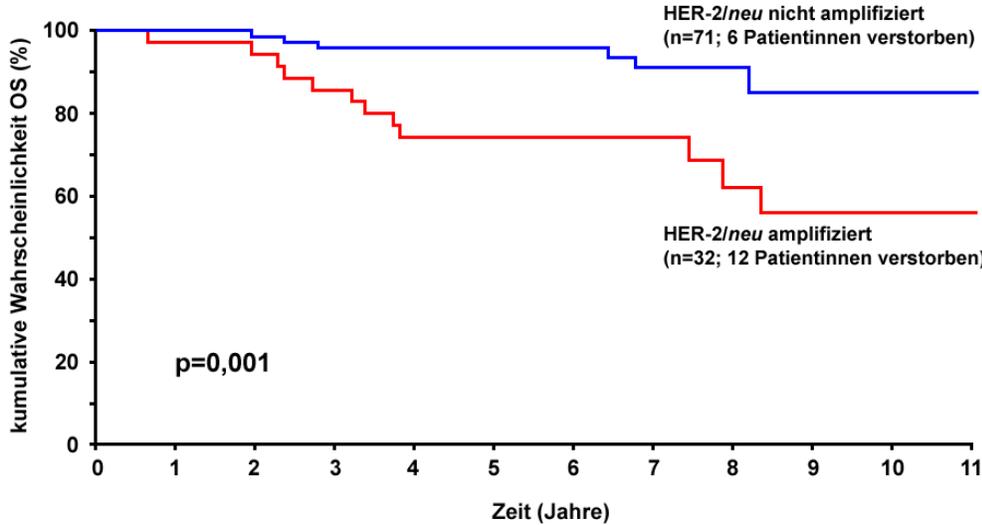


Abbildung 9a: Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von HER-2/*neu* Protein-Überexpression (IHC) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

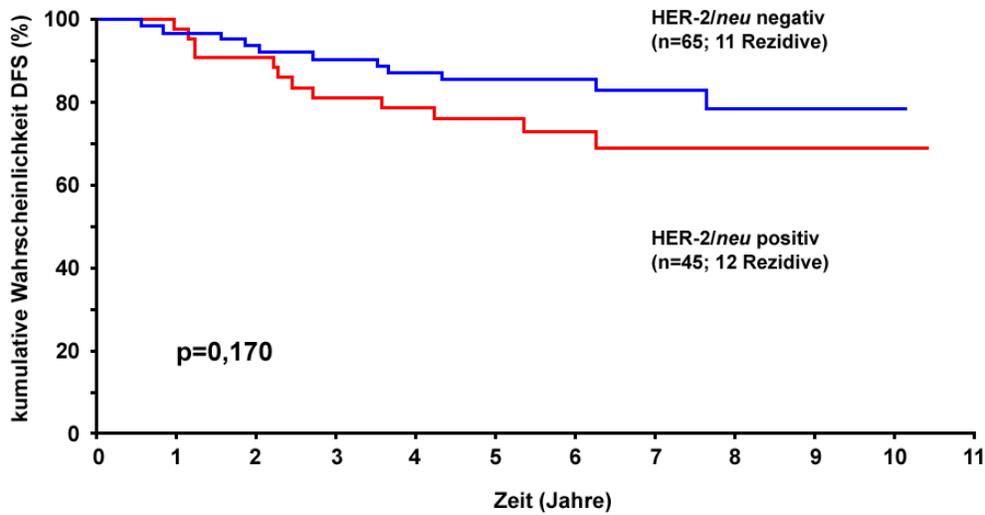


Abbildung 9b: Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von HER-2/*neu* Protein-Überexpression (IHC) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

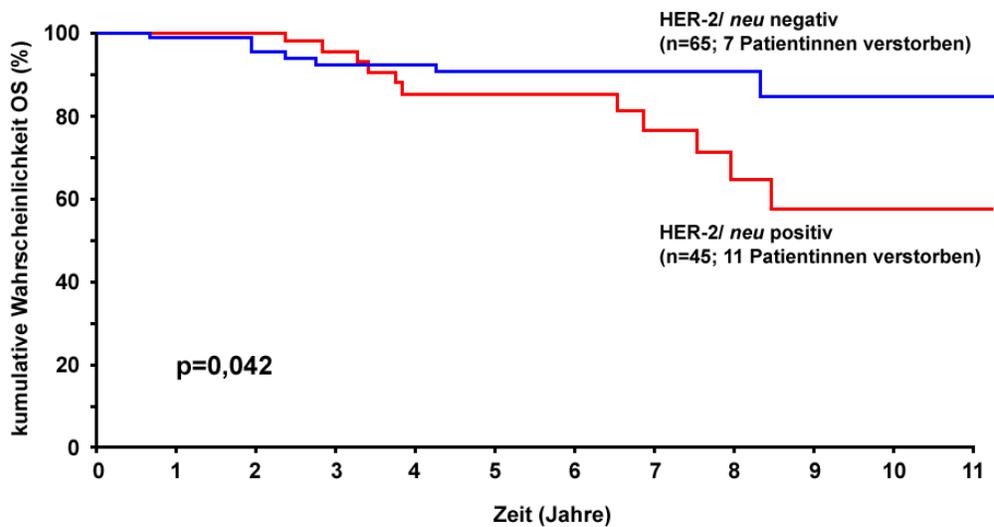


Abbildung 10: Das mit der HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (FISH) assoziierte Relative Rezidivrisiko innerhalb der Subgruppen der nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen, die durch die etablierten Prognosefaktoren definiert wurden.

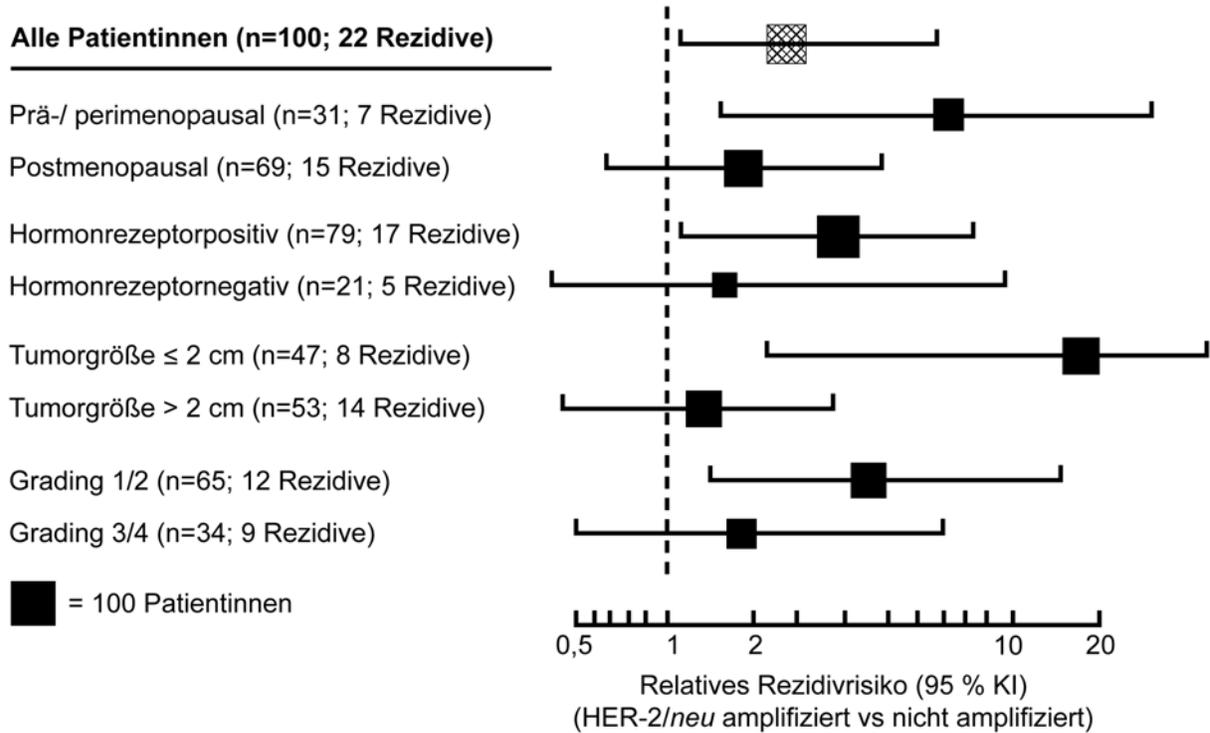


Abbildung 11a: Kombination von uPA/PAI-1 und HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (FISH) und deren Einfluss auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom.

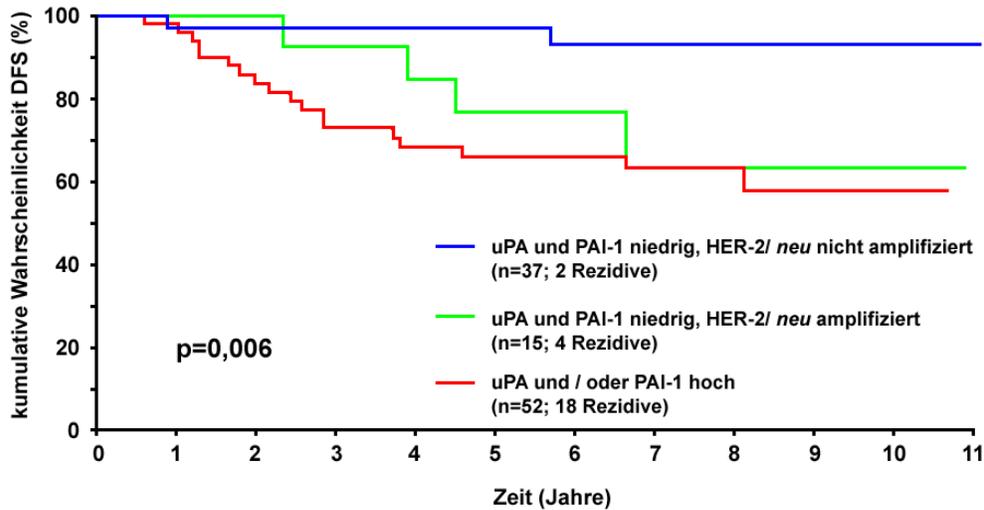


Abbildung 11b: Kombination von uPA/PAI-1 und HER-2/*neu* Gen-Amplifikation (FISH) und deren Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit (OS) im nodal-negativen Mammakarzinom.

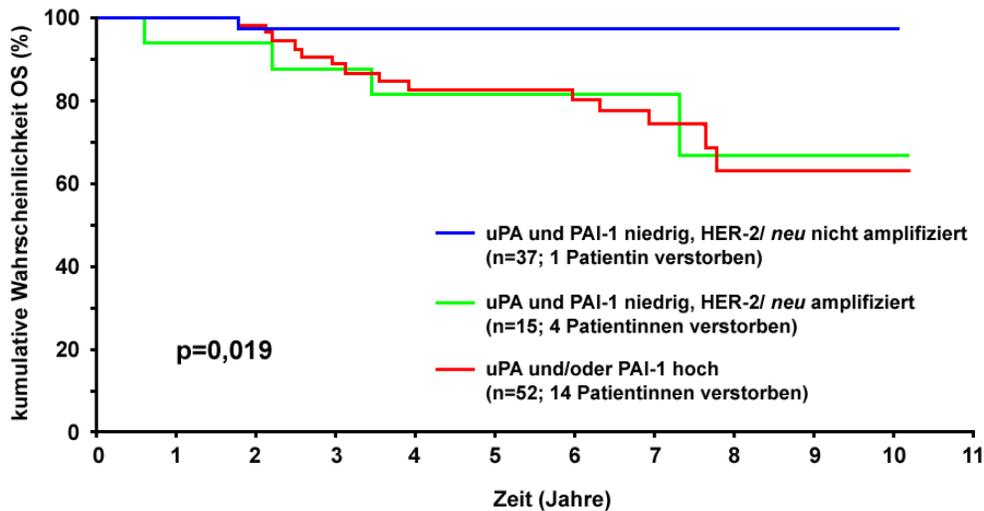


Abbildung 12: Einfluss der Kombination uPA/PAI-1 (beide Faktoren unterhalb des Cut-Off im Vergleich zu einem bzw. beiden Faktoren oberhalb des Cut-Off) auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom.

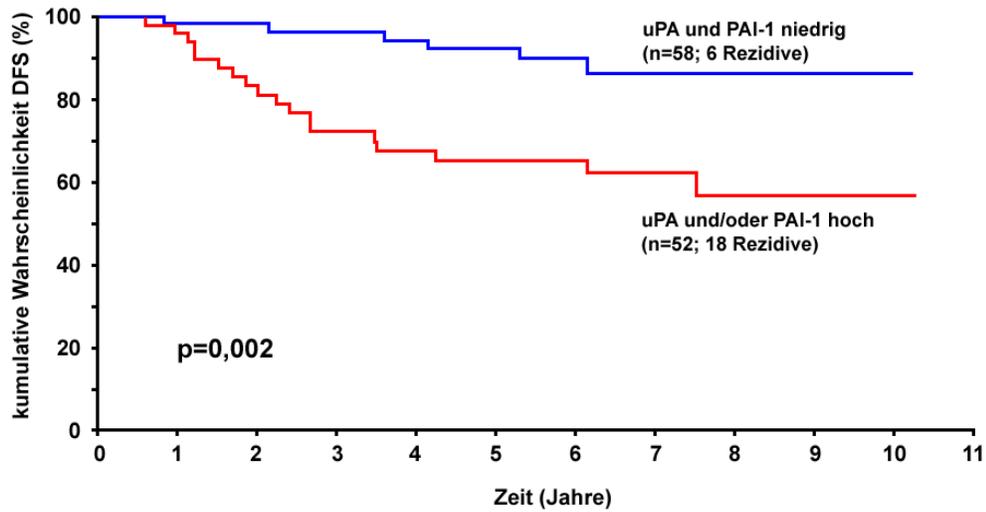


Abbildung 13a: Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von uPA bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

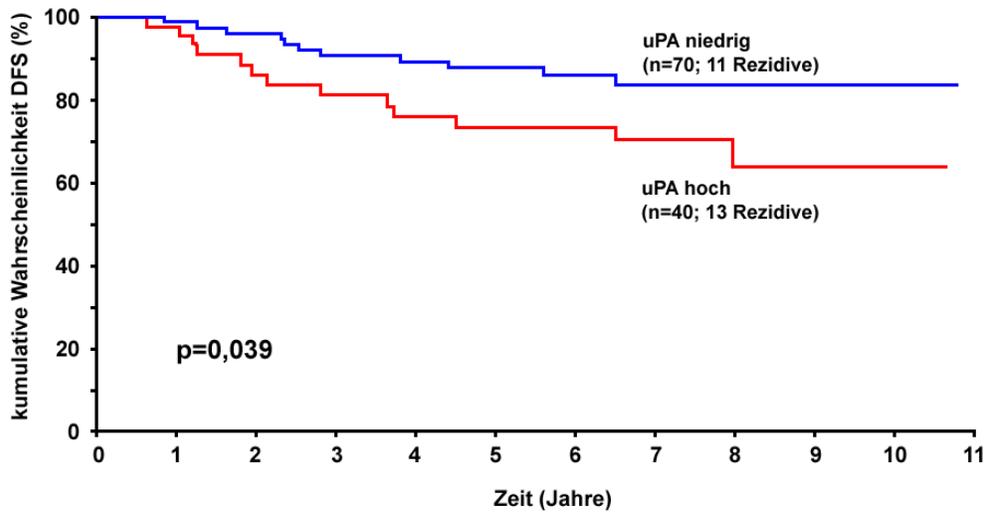


Abbildung 13b: Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von uPA bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

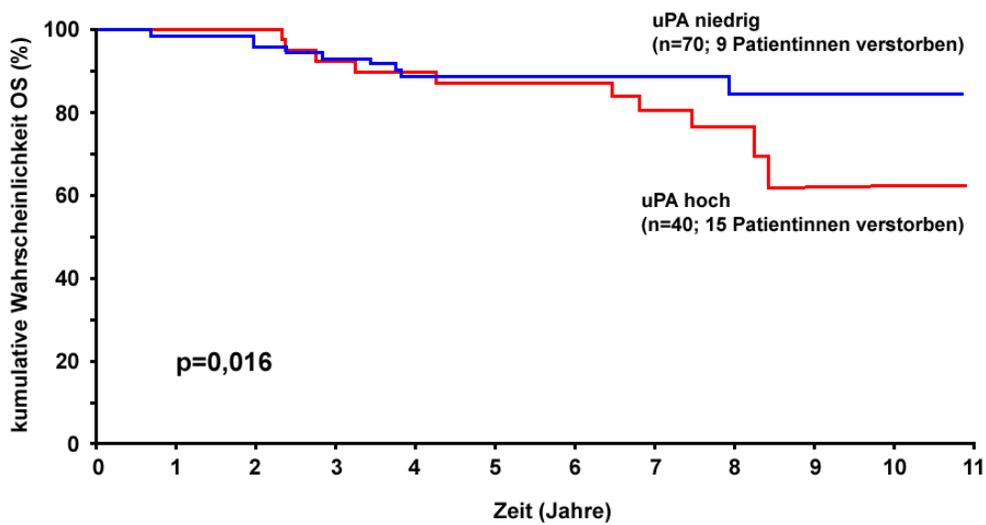


Abbildung 14a: Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von PAI-1 bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

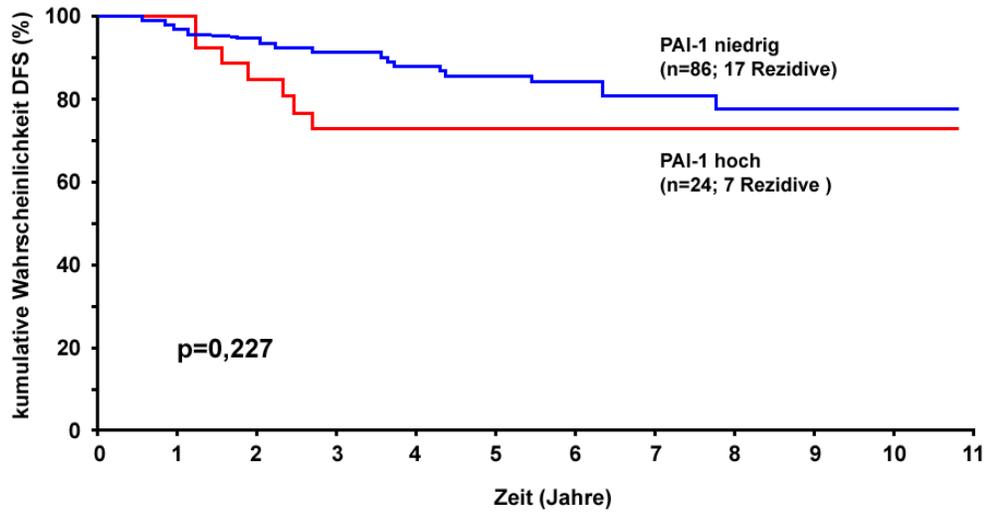
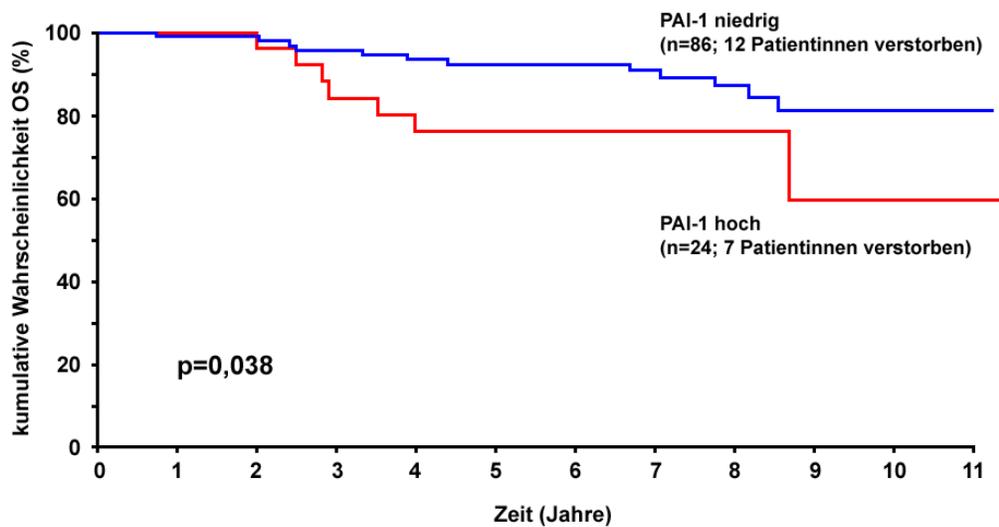


Abbildung 14b: Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von PAI-1 bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.



5 Diskussion

5.1 Methoden der HER-2/*neu* Bestimmung

In Hinblick auf die angemessene Methodik, um den HER-2/*neu* Status im klinischen Rahmen zu bewerten, hat man bis jetzt noch keine Übereinstimmung erreicht.

Die **immunhistochemische Färbung (IHC)** (die überwiegende Methode zur Bestimmung der HER-2/*neu* Proteinanomalie beim Mammakarzinom), kann durch technische Probleme, vor allem bei archivalisch in paraffineingebetteten Gewebe, bedeutsam verändert werden. Die Zeit und die Art der Gewebefixation, die Gewebearbeitungsmethode und die Temperatur der Paraffineinbettungsprozedur werden nicht immer gut kontrolliert und können letztendlich zu einem Abbau des HER-2/*neu* Proteins führen. Eine verlängerte Aufbewahrungszeit ist ebenfalls mit einem signifikanten Verlust der Intensität der Immunfärbung der Tumormarker assoziiert (*Jacobs et al., 1996*). Der Vorgang der Gewebefixation kann einen wichtigen Einfluss auf die HER-2/*neu* Immunfärbung haben, wie z.B. verschiedene Antikörper zeigen unterschiedliche Färbemuster je nachdem wie die Zellen fixiert wurden (*Penault-Llorca et al., 1994*). Studien über die verschiedenen im Handel erhältlichen Antikörper zeigten ebenfalls eine weite Vielfalt an Sensitivität und Spezifität bei Verwendung an fixiertem, paraffineingebettetem Gewebe (*Busmanis et al., 1994; Press et al., 1994*). Ausserdem kann man nicht kontrollieren, ob es nicht durch die Bedingungen der Fixation, des Einbettens, des Aufbewahrens und der Temperatur zu Verminderungen des Antigenbestandes kommt (*Ross JS: persönliche Mitteilung, 1998*) (**Tabelle 7**). Der Gebrauch von Antigen-Retrievaltechniken (Zielamplifikation) ist darüber hinaus auch eine mögliche Quelle einer falsch-positiven Färbung durch die nicht-spezifische Bindung des Antikörper-Reagenzes. Ein anderes wichtiges Problem stellt das Fehlen eines einheitlichen Scoringsystems der HER-2/*neu* Proteinbestimmung mit IHC dar. Kürzlich wurden Versuche unternommen, um eine Übereinstimmung zu erlangen (*Van Diest et al., 1997*). Die **Vorteile der IHC-Methode** sind, dass diese Methode relativ kostengünstig ist, man die Ergebnisse am selben Tag erhalten kann, es eine gängige Methode ist und die Schnitte mittels des Lichtmikroskops zum wiederholten Male inspiziert werden können.

Die ELISA-Technik, falls sie an Tumorzytosol, das aus frischen Gewebeproben stammt, angewandt wird, vermeidet die potentielle Antigenbeschädigung, die mit der Fixation, Einbettung und unkontrollierten Lagerung in Verbindung gebracht werden kann. In drei Studien mit 315 Patientinnen korrelierten auf ELISA basierende Messungen des HER-2/*neu* Proteins im Tumorzytosol einheitlich mit dem Krankheitsverlauf (*Dittadi et al., 1997; Eissa et al., 1997; Slamon et al., 1998*). Jedoch die geringe Grösse der Mammakarzinome, die mit einem ausgedehnten Screeningprogramm assoziiert sind, könnten eine Anwendung der ELISA-Methoden ausschliessen, falls nur ungenügend Tumorgewebe zur Herstellung des Zytosols vorhanden ist. Western Blots können ebenfalls zur Bestimmung der HER-2/*neu* Protein-Überexpression sowohl im Tumorzytosol als auch bei archiviertem Gewebe benutzt werden, aber sind im allgemeinen unpraktisch für eine Routineuntersuchung.

Die ersten auf Genen basierenden HER-2/*neu* Detektionsmethoden, die bei Mammakarzinomproben angewandt wurden, sind Southern und Slot Blots. Die Ergebnisinterpretation kann stark gehandikapt sein, wenn die aus malignem Gewebe stammende Tumorzell-DNA mit der DNA aus benignen Tumoren und aus Entzündungszellen verdünnt wird.

Die **FISH-Technik** für das HER-2/*neu*, die jetzt ähnlich wie die IHC automatisiert ist, erlaubt zur gleichen Zeit eine morphologische Bewertung sowie eine Auswertung der Ergebnisse der Gen-Amplifikation einzig und allein auf Karzinomzellen. Diese Methode zur Bestimmung der HER-2/*neu* Genanomalie beim Mammakarzinom hat sich als zuverlässiger und informativer als die Southern Blot Analyse bewährt (*Press et al., 1997*). Die FISH-Technik wurde von *Press* als eine schnelle, reproduzierbare, sehr gut verwendbare Methode zur Bestimmung von HER-2/*neu* Gen Amplifikation beschrieben (*Press et al., 1997*). Der **Vorteil** dieser Technik ist, dass sie an Paraffinblöcken, die über einen längeren Zeitraum aufbewahrt wurden, und auch bei Feinnadelaspirationsbiopsien erfolgreich angewendet werden kann (*Sauter et al., 1996*). Durch die direkte Darstellung des Gens mittels des fluoreszierenden Signals ist eine Lokalisation des Gens im Kern möglich und das Erfassen der Anzahl der Genkopien für den jeweiligen Kern gegeben. Dabei kann sich der Kern entweder in der Interphase oder aber auch in der Metaphase befinden. Ausserdem kann die FISH-Methode sowohl an Kernsuspensionen als auch an Gewebeschnitten, deren Morphologie während des Vorgangs erhalten bleibt und dadurch eine Differenzierung zwischen einem invasiven und einem Carcinoma in Situ (CIS) möglich ist, durchgeführt werden

(Kallioniemi et al., 1992). Bei einer notwendigen Erfahrung des Labors führt die Methode schon innerhalb von 24 Stunden zum Ergebnis (Ross JS: persönliche Mitteilung, 1998). Der Hauptnachteil der FISH-Methode ist, dass manuelle Zählungen notwendig sind, um die Höhe der Genkopien beurteilen zu können (Press et al., 1997).

Tabelle 7: Vergleich der IHC- und FISH-Methode zur Darstellung von Anomalien des HER-2/neu Gens und Proteins (Ross et al., 1998)

Methoden	IHC	FISH
Dargestellte Anomalie	Protein-Überexpression	Gen-Amplifikation
Benutzung von Archivmaterial	ja	ja
Verwendung von Paraffinschnitten	ja	ja
Beeinflussung durch Fixation, Hitze, Lagerung	ja	nein
Anwendung an Nadelbiopsien & Abstrichen	ja	ja
Anwendung an Tumoren < 1cm	ja	ja
Standardisierte Technik	nein	ja
Sensitivität & Spezifität	hoch	höher
Viele auf dem Markt verfügbare Reagenzien	ja	nein
Fluoreszenzmikroskop notwendig	nein	ja

5.2 Klinische Bedeutung der HER-2/neu Bestimmung

Das HER-2/neu Proto-Onkogen und sein Genprodukt, das HER-2/neu Protein, werden für die Behandlung des Mammakarzinoms, aufgrund ihres prognostischen Einflusses, der die Identifikation derjenigen Patientinnen, mit erhöhtem Risiko eine Metastase zu entwickeln, erlaubt, immer interessanter.

In der vorliegenden Studie konnten wir die **klinische Relevanz der mittels FISH bestimmten HER-2/neu AMP** bestätigen, indem wir zeigten, dass die **HER-2/neu Gen-Amplifikation eine signifikante Risikogruppeneinteilung** erlaubt. Zusätzlich konnten wir den prognostischen Einfluss von HER-2/neu AMP im Vergleich mit der immunhistochemischen HER-2/neu Protein-Überexpression, den etablierten prognostischen Faktoren und den Tumorinvasionsmarkern uPA und PAI-1 bewerten. In unserer Patientinnengruppe war **HER-2/neu AMP** ein hochsignifikanter Faktor zur Risikogruppeneinschätzung und war der

HER-2/*neu* EXP gemessen mit IHC in der Voraussage der **rezidivfreien- und Gesamtüberlebenszeit** der **nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen überlegen**. Dieses Ergebnis stimmte mit einer vorherigen Studie (*Harbeck et al., 1998*) überein, bei der die HER-2/*neu* EXP mittels IHC keine prognostische Signifikanz bei nodal-negativen Patientinnen aufwies. Der beobachtete statistische unabhängige Einfluss der HER-2/*neu* AMP mittels FISH bestätigt Berichte über die prognostische Wertigkeit der HER-2/*neu* Gen-Amplifikation in anderen Kollektiven von nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen (*Press et al., 1997; Andrulis et al., 1998*). Dies ist eine wichtige Tatsache, weil frühere Studien, die überwiegend auf der Immunhistochemie basierten, eine prognostische Signifikanz des HER-2/*neu* Status unter den nodal-negativen Patientinnen (*Revillon et al., 1998; Clark, 1996*) nicht zeigen konnte.

Ausserdem **übertraf** die **HER-2/*neu* AMP bestimmt mittels FISH** die Tumorgrosse, das Grading, den Steroidhormonrezeptor- und Menopausenstatus im Bezug auf die Voraussage des Krankheitsverlaufs bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom. Ihre **prognostische Stärke** war mit der der **Tumorinvasionsmarkern uPA und PAI-1 vergleichbar**. In der Multivarianzanalyse mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von sieben Jahren war die HER-2/*neu* AMP als prognostischer Marker für DFS bei nodal-negativen Patientinnen vergleichbar mit der von uPA und PAI-1. Diese Daten stimmen mit früheren klinischen Beobachtungen (*Jänicke et al., 1993; Foekens et al., 1994*), die uPA und PAI-1 eine zentrale Rolle bei Tumorinvasion und Metastasierung beimessen, überein.

Es gibt keine früheren Publikationen über die Bestimmung von uPA/PAI-1 und HER-2/*neu* an einem gleichen Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen. In unserem Patientinnenkollektiv wurde **keine signifikante Korrelation** zwischen **uPA** und **PAI-1** und **HER-2/*neu*** gefunden. Wir waren erstmalig in der Lage zu zeigen, dass die **HER-2/*neu* AMP** die **prognostische Risikogruppeneinteilung**, die mit dem **uPA** und **PAI-1** bei **nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen** erreicht wurde, **unabhängig verbessern** kann.

Sogar unter den Niedrigrisikopatientinnen mit einem geringen Wert beider proteolytischer Faktoren (*Jänicke et al., 1994a; Harbeck et al., 1999*) ist die HER-2/*neu* AMP in der Lage, Subgruppen mit einer sehr geringen Rückfallrate von weniger als 5% nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von sieben Jahren zu erkennen. Während die Risikogruppeneinteilung basierend auf der **HER-2/*neu* Positivität** weniger als ein Drittel der Mammakarzinompatientinnen in die Hochrisikogruppe einschliesst, werden bei der

Anwendung des **uPA/PAI-1** zur Risikogruppenunterscheidung ungefähr die Hälfte der Patientinnen in die Hochrisikogruppe eingeteilt (*Jänicke et al., 1994a*). Folglich könnte die **Kombination** dieser beiden tumorbiologischen Systeme zur **Risikogruppeneinteilung** bei nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen, eine **Identifikation** eines klinisch relevanten Prozentsatz von **Niedrigrisikopatientinnen** (z.B. 39% in unserer Studie) ermöglichen. Bei der Kombination dieser beiden tumorbiologischen Systeme mit dem Grading konnte das Niedrigrisikokollektiv noch besser charakterisiert werden, jedoch wurde dadurch das Kollektiv immer kleiner.

Da beim nodal-positiven Mammakarzinom die Mehrzahl der Patientinnen eine adjuvante systemische Therapie erhält, ist der prognostische Einfluss des HER-2/*neu* bei nodal-positivem Mammakarzinom als prädiktiver Faktor teilweise vom Therapieansprechen bzw. Therapieversagen beeinflusst. Jedoch in nodal-negativen Mammakarzinomstudien, in denen die meisten Patientinnen keine adjuvante systemische Therapie erhalten (*Press et al., 1997; Andrulis et al., 1998*), könnte die prognostische Bedeutung des HER-2/*neu* Gens und der Proteinanomalie tatsächlich eine aggressivere Tumorbiologie widerspiegeln. Dennoch besteht das dringende klinische Interesse an dem HER-2/*neu* nicht nur in seiner **prognostischen Stärke** sondern auch in seiner **prädiktiven Bedeutung** hinsichtlich des Ansprechens einer Therapie. Neueste Daten deuten daraufhin, dass das HER-2/*neu* Rezeptorprotein als ein effektiver Angriffspunkt für eine **tumorbiologische Therapie** mit dem humanisierten anti-HER-2/*neu*-Antikörper HerceptinTM dienen könnte (*Slamon et al., 1998*). Aufgrund dieser zunehmenden Applikation ist ein internationaler Konsens hinsichtlich der geeignetsten Methodik zur Bewertung des HER-2/*neu* Status für die klinische Routine wie z.B. die HER-2/*neu* Gen-Amplifikation und/oder die HER-2/*neu* Protein-Überexpression, dringend notwendig. Erste Daten deuten daraufhin, dass HER-2/*neu* AMP mittels FISH den Therapieerfolg bei einer Herceptin-Behandlung besser vorhersagt als HER-2/*neu* EXP mittels IHC (*Mass et al., 2000*).

Zum Abschluss kann man sagen, dass bei unseren nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen die HER-2/*neu* Gen-Amplifikation bestimmt mit FISH eine genauere Risikogruppeneinteilung erlaubt als die HER-2/*neu* Protein-Überexpression bestimmt mit der IHC. Die HER-2/*neu* Gen-Amplifikation mittels FISH lieferte auch bessere prognostische Informationen als die etablierten prognostischen Faktoren. Ausserdem könnte der signifikante Einfluss der HER-2/*neu* Gen-Amplifikation auf die Gesamtüberlebenszeit der

Patientin seine Fähigkeit, eine Resistenz gegenüber einer systemischen Therapie vorherzusagen, widerspiegeln. Wenn die HER-2/*neu* Gen-Amplifikation Messungen mit Immunassays für die Invasionsmarker uPA und PAI-1 kombiniert werden, werden zusätzliche prognostische Informationen hervorgebracht, die beim nodal-negativen Mammakarzinom eine klinische Relevanz für Therapieentscheidungen haben könnten

Tabelle 8: Vergleich verschiedener Publikationen zur Bedeutung von HER-2/*neu* bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom.

Autor	Methode	Präparat	Pat. (N(0))	↑HER-2/ <i>neu</i> Pat.(%)	↑HER-2/ <i>neu</i> N0 (%)	Ergebnis	Prog. Bedeutung
Slamon et al., (1987a)	Southern Blot	Gefrier-schnitt	103 (34)	19 (18%)	4 (11%)	↑AMP führt zu geringerem OS, DFS	U: ja M: ja
Lovekin et al., (1991)	IHC (polykl. 21-N-Ak)	Paraffin	667 (250)	111 (17%)		EXP & OS sind mit T-Stadien assoziiert	U: ja M: ja
Kallioniemi et al., (1991)	IHC (monokl. Mab1-Ak)	Paraffin	319 (174)	72 (23%)	29 (17%)	EXP ist mit Prolif. & Metastasierungsmuster assoziiert.	M: ja
Press et al., (1993)	IHC (polykl. R60-AK)	Paraffin	210 (210)	63 (30%)	63 (30%)	N(0): EXP führt zu erhöhten Rezidivrate	U: ja M: ja
Quenel et al., (1995)	IHC (polykl. Dako-Ak)	Paraffin	942 (398)	229 (24%)	95 (24%)	N(0): EXP ist mit schlechter Prognose assoziiert	U: ja M: ja
Eissa et al., (1997)	ELISA	Zytosol	100 (23)			HER-2/ <i>neu</i> sagt ein Rezidiv am besten voraus	U: ja M: ja
Press et al., (1997)	FISH	Paraffin	324 (324)	57 (18%)	57 (18%)	N(0): OS & DFS sind mit AMP assoziiert.	U: ja M: ja
Harbeck et al., (1999)	FISH IHC	Paraffin Paraffin	103 (103) 110 (110)	32 (31%) 45 (41%)	32 (31%) 45 (41%)	OS&DFS mit AMP assoziiert. Nur OS mit EXP assoziiert.	U:ja; M:ja U:ja; M:ja

Ak Antikörper

AMP HER-2/*neu* Amplifikation

DFS rezidivfreies Überleben

EXP HER-2/*neu* Protein-Überexpression

↑HER-2/*neu* erhöhte HER-2/*neu* Amplifikation bzw. Protein-Überexpression

T-Stadien Tumorstadien

monokl. monoklonal

N (0) nodal-negative Patientinnen

OS Gesamtüberlebenszeit

Pat Patientinnenzahl

polykl. polyklonal

U Univarianzanalyse

M Multivariaianalyse

6 Zusammenfassung

In einem Kollektiv mit **112 nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen** verglichen wir den prognostischen Einfluss der **HER-2/neu Gen-Amplifikation**, die mittels der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (**FISH**) gemessen wurde, und der **HER-2/neu Protein-Überexpression**, die mittels der Immunhistochemie (**IHC**) bestimmt wurde, mit den **traditionellen Prognosefaktoren** (Tumorgrösse, Grading, Steroidhormonrezeptorstatus, Menopausenstatus) und Tumorinvasionsmarkern **uPA** (Urokinase Plasminogenaktivator) und seinem Inhibitor **PAI-1**, die mittels **ELISA** bestimmt wurden. Die mediane Nachbeobachtungszeit der zum Zeitpunkt der Analyse noch lebenden Patientinnen entsprach sieben Jahre. FISH und IHC wurden an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten durchgeführt. HER-2/neu AMP wurde mittels FISH in 31% und HER-2/neu EXP mittels IHC in 41% der Fälle festgestellt. In 13% der Tumoren wurden sowohl AMP als auch FISH gefunden. Die FISH und IHC Ergebnisse waren in 56% aller analysierten Fälle konkordant. In der **Univarianzanalyse** sagte HER-2/neu AMP sowohl die rezidivfreie (**DFS**) als auch Gesamtüberlebenszeit (**OS**) signifikant voraus. Die HER-2/neu EXP war hingegen nur für das OS signifikant. In der **Multivarianzanalyse** aller analysierten Prognosefaktoren war die HER-2/neu AMP der einzige unabhängige prädiktive Faktor sowohl für DFS als auch für OS. Die **CART-Analyse** deckte auf, dass die HER-2/neu AMP zusammen mit der Kombination von uPA/PAI-1 nach einer **siebenjährigen medianen Nachbeobachtungszeit** eine optimale Risikogruppeneinschätzung erlaubt: Patientinnen mit einem geringen Tumorgewebegehalt an uPA und PAI-1 und keiner HER-2/neu AMP hatten ein signifikant geringere Rezidivrate (4,6%) als die übrigen Patientinnen (32%). Zusammenfassend kann man sagen, dass die HER-2/neu Gen AMP bestimmt mittels FISH eine exaktere **Risikogruppeneinschätzung** erlaubt, als die HER-2/neu Protein EXP gemessen mittels der IHC. Die Kombination des HER-2/neu Gen-Status (FISH), mit den Tumorinvasionsmarker uPA und PAI-1 verbessert die klinische Relevanz der Risikogruppeneinschätzung. Zusätzlich zu seiner prognostischen Stärke könnte der signifikante Einfluss der HER-2/neu AMP in bezug auf OS, ein Nichtansprechen auf die verabreichte systemische Therapie, widerspiegeln.

7 Literaturverzeichnis

Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff M, Eudey L, Co-operating Investigators: "*Her-2/neu node-negative breast cancer. Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma.*" J Clin Oncol 10: 599-605, 1992.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: "*The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis*". A review. Int J Cancer 71: 1-22, 1997.

Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KPH, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D for the Toronto Breast Cancer Study Group: "*New/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer.*" J Clin Oncol 16: 1340-1349, 1998.

Astedt B, Holmberg L: "*Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture.*" Nature 261: 595-597, 1976.

Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusening NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: "*Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularisation.*" Nat Med 4: 923-928, 1998.

Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch H-G, Bender HG: "*Significance of members of the erbB-gene family for tumour development as prognostic factors and novel therapeutic options.*" Geburtsh Frauenheilk 53: 742-753, 1993.

Behrens J: "*The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis.*" Breast Cancer Res Treat 24: 175-184, 1993.

Binder BR: "*Influence of urokinase on cell proliferation and invasion.*" Blood Coagul Fibrinolysis 1: 717-720, 1990.

Blankenstein MA: "*Biochemical assessment of tissue prognostic factors in breast cancer.*" Breast 6: 31-37, 1997.

Blasi F, Vassalli JD, Dano K: "*Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors*". J Cell Biol 104: 801-804, 1987.

Bouchet C, Spyrtatos F, Martin PM, Hacéne K, Gentile A, Oglobine J: "*Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas.*" Br J Cancer 69: 398-405, 1994.

Breiman I, Friedman J, Olshen R, Stone C: "*Classification and regression trees*". Chapman and Hall, New York, 1984.

Brüner N, Pyke C, Hansen CH, Romer J, Grondahl-Hansen J, Dano K: "*Urokinase plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1): regulators of proteolysis during cancer invasion and prognostic parameters in breast cancer.*" *Cancer Treat Res* 71: 299-309, 1994.

Busmanis I, Feleppa F, Jones A, McGrath KM, Reed R, Collins J, Russel I, Begley CG: "*Analysis of *cerbB-2* expression using a panel of six commercially available antibodies.*" *Pathology* 26: 261-267, 1994.

Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S: "*c-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases.*" *J Clin Oncol* 14: 2702-2708, 1996.

Clark GM, McGuire W: "*Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer.*" *Semin Oncol* 15: 20-25, 1988.

Clark GM: "*Do we really need prognostic factors for breast cancer?*" *Breast Cancer Res Treat* 30: 117-126, 1994.

Clark GM: "*Prognostic and predictive factors: Diseases of Breast*", edited by Jay R. Harris, Marc E. Lippman, Monica Morrow, Samuel Hellman. Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

Cox DR: "*Regression models and life-tables.*" *J R Statist Soc (B)* 34: 187-200, 1972.

Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu BK, Shuman MA, Levinson AD: "*Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor.*" *Proc nat Acad Sci (Wash.)* 90: 5021-5025, 1993.

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skyiver L: "*Plasminogen activators, tissue degradation and cancer.*" *Adv Cancer Res* 44: 139-266, 1985.

De Potter CR: "*The neu oncogene: more than a prognostic indicator?*" *Hum Pathol* 25: 1264-1268, 1994.

Dittadi R, Brazzale A, Pappagallo G, Salbe C, Nascrimben O, Rosabian A, Gion M: "*ErbB-2 assay in breast cancer: possibly improved clinical information using a quantitative method.*" *Anticancer Res* 17: 1245-1247, 1997.

Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ: "*Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas.*" *Cancer* 62: 531-533, 1988.

Duffy MJ, Reilley D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JN, Andreasen P: "*Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer.*" *Cancer Res* 50: 6827-6829, 1990.

Duffy MJ: "*The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis.*" *Clin Exp Metastasis* 10: 145-155, 1992.

Duffy MJ: "*Urokinase plasminogen activator and malignancy.*" *Fibrinolysis* 7: 295-302, 1993.

Duffy MJ: "*Proteases as prognostic markers in cancer.*" *Clin Cancer Res* 2: 613-618, 1996.

Eissa S, Khalifa A, El-Gharib A, Salah N, Mohamed MK: "*Multivariate analysis of DNA ploidy , p53, c-erbB-2 proteins, EGFR, and steroid hormone receptors for short-term prognosis in breast cancer.*" *Anticancer Res* 17: 3091-3097, 1997.

Ergebnisse einer Konsensuskonferenz: "*Prognostische und therapierelevante Faktoren beim Mammakarzinom.*" In Classen S, Graeff H, Jänicke F, Sauer H, Wilmanns W (Hrsg.): *Excerpta Oncologica Novartis. Novartis-Verlag, Nürnberg 1997*

Fernö M, Borg A, Killander D, Hirschberg L, Brundell J: "*Urokinase plasminogen activator as prognostic factor in breast cancer: measured with a novel immunoluminometric assay suited for routine use.*" *Breast cancer Res Treat* 32: 30, 1994.

Fernö M, Bendahl PO, Borg A, Brundell J, Hirschberg L, Olsson H, Killander D: "*Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay.*" *Eur J Cancer* 32A: 793-801, 1996.

Foekens JA, Schmitt M, Pache L, Van Putton W, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JGM: "*Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients.*" *Cancer Res* 52: 6101-6105, 1992.

Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Jänicke F, Klijn JGM: "*Plasminogen activator inhibitor-1 and breast cancer metastasis.*" *J Clin Oncol* 12: 1648-1658, 1994.

Goldhirsch A, Gelber RD, Simes RJ, Glasiou P, Coates AS: "*Costs and benefits of adjuvant therapy in breast cancer: a quality-adjusted survival analysis.*" *J. Clin. Oncol.* 7, 1: 36-44, 1989.

Goodson RJ, Doyle MV, Kaufmann SE, Rosenberg S: "*High affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display.*" *Prog nat Acad Sci (Wash)* 91: 7129-7133, 1994.

Graeff H, Wilmanns W, Jänicke F, Sauer H, Classen S: "*Prognostische und therapierelevante Faktoren beim Mammakarzinom. Ergebnisse einer Konsensuskonferenz.*" *Onkologie* 3: 409-412, 1997.

Grohndahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brünner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M: „*High levels of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis.*“ *Cancer Research* 53: 2513-2521, 1993.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam C-M, Golouh R, Reed R, Martinez-Tello F, Tiltman A, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Bürki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn HJ: „*Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer.*“ *Clin Oncol* 10(7): 1049-1056, 1992.

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K, Jänicke F, Höfler H, Graeff H, Schmitt M: „*Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer*“. *Anticancer Res* 18: 2187-2198, 1998.

Harbeck N : „*Klinische Bedeutung von Proliferation- und Invasionsfaktoren beim Mammakarzinom.*“, Habilitationsschrift an der TU München 1998.

Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, Jänicke F, Höfler H, Graeff H, Schmitt M: „*Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up.*“ BCRT, 1999.

Human Gene Mapping 11, 1991. London Conference (1991) Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping; Cytogenet. Cell Genet., Solomon, E., Rawlings, C., eds., Karger, New York, 58 (1-4): 702.

Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schmitt SJ: „*Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer.*“ *J Natl Cancer Inst* 88: 1054-1059, 1996.

Jänicke F, Schmitt M, Ulm K, Gössner W, Graeff H: „*Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer.*“ *Lancet* 8670: 1049, 1989.

Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Holrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H: „*Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer.*“ *Fibrinolysis* 4: 69-78, 1990.

Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: „*Clinical relevance of the urokinase-type and the tissue-type plasminogen activators and of their inhibitor PAI-1 in breast cancer.*“ *Seminars in Thromb Haemostas* 17: 303-312, 1991.

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: „*Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong, independent prognostic factors in node-negative breast cancer.*“ *Breast Cancer Res Treat* 24: 195-208, 1993.

Jänicke F, Thomsson C, Pache L, Schmitt M, Graeff H: „*Urokinase (uPA) and PAI-1 as selection criteria for adjuvant chemotherapy in axillary node-negative breast cancer patients.*“ In: *Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer*. Schmitt M, Graeff H and Jänicke F (eds). Elsevier Science, pp207-218, 1994a.

Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtel A, Graeff H: "*Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1.*" *Cancer Res* 54: 2527-2530, 1994b.

Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin H, Isola J.: "*Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increasing risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer.*" *Int J Cancer* 49: 650-655, 1991.

Kalogeraki A, Tzarsi M, Datselis G, Kanavaros P, Karvelas C, Chalkiadakis G, Tsiftsis D, Delites G: "*c-erbB-2: Expression in patients with breast carcinoma in comparison to patients with benign breast diseases.*" *Anticancer Research* 16: 765-772, 1996.

Kaplan EL, Meier P: "*Non-parametric estimation from incomplete observations.*" *J Am Statist Assoc* 53: 457-481, 1958.

Klijn JGM, Berns EMJJ, Bontenbal M, Foekens J: "*Cell biological factors associated with the response of breast cancer to systemic treatment.*" *Cancer Treat Rev* 19: 45-63, 1993.

Knoop A, Andreasen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen ACW, Andersen J, Overgaard J and Rose C: "*Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer.*" *Br J Cancer* 77: 932-940, 1998.

Kobayashi H, Ohi H, Shinohara H, Sugimura M, Fujie T, Terao T, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Jänicke F, Graeff H: "*Saturation of tumor cell surface receptors for urokinase-type plasminogen activator by amino-terminal fragment and subsequent effect on reconstituted basement membranes invasion.*" *Brit J Cancer* 67: 537-544, 1993.

Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, Shinohara H, Moniwa N, Terao T: "*Inhibition of metastasis of Lewis lung carcinoma by synthetic peptide within growth factor-like domain of urokinase in the experimental and spontaneous metastasis model.*" *Int J Cancer* 57: 727-733, 1994a.

Kobayashi H, Shinohara H, Takeuchi K, Itoh M, Fujie T, Satoh M, Terao T: "*Inhibition of the soluble and the tumor cell receptor-bound plasmin by urinary trypsin inhibitor and subsequent effects on tumor cell invasion and metastasis.*" *Cancer Res* 54: 844-849, 1994b.

Kobayashi H, Gotoh J, Hirashima Y, Fujie M, Sugino D, Terao T: "*Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro.*" *J biol Chem* 270: 8361-8366, 1995.

Kute TE, Grohndahl-Hansen J, Shao SM, Long R, Russell G, Brüner N: "*Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence.*" *Breast Cancer Res Treat* 47: 9-16, 1998.

Laiho M, Keski-Oja: "*Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review.*" *Cancer Res* 49: 2533-2553, 1989.

- Lauffenburger D: "*Making connections count.*" Nature 383: 390-391, 1996.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: "*Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.*" Cell 64: 327-36, 1991.
- Liu G, Shuman MA, Cohen RL: "*Co-expression of urokinase, urokinase-receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells.*" Int J Cancer 60: 501-506, 1995.
- Loaiciga K, Beckmann MW, Niederacher D, Tutschek B, Engels K, Klockenbush W, Schnurch H-G, H-G Bender: "*p185/Her2 and pS2 protein overexpression in breast cancer specimens: Improvement for prediction of response to endocrine therapy.*" Oncology Reports 1: 625-629, 1994.
- Lovekin C, Ellis IO, Locker A, Robertson JF, Bell J, Nicholason R, Gullick WJ, Elston CW, Blamey RW: "*C-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer.*" Br J Cancer 63: 439-443, 1991.
- Lu H, Yeh P, Guitton JD, Mabilat C, Desanlis F, Maury I, Legrand Y, Soria J, Soria C: "*Blockage of the urokinase receptor on the cell surface: construction and characterisation of a hybrid protein consisting of the N-terminal fragment of human urokinase and human albumin.*" FEBS Lett 356: 56-59, 1994.
- Lu H, Mabilat C, Yeh P, Guitton JD, Li H, Pouchelet M, Shoevaert D, Legrand Y, Soria J, Soria C: "*Blockage of urokinase receptor reduces in vitro the motility and the deformability of endothelial cells.*" FEBS Lett 380: 21-24, 1996.
- Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K: "*Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance.*" Semin Cancer Biol 6: 135-145, 1991.
- Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, Ashley SE, Ormerod MG, Titley JC, Gregory RK, Allred DC: "*Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas.*" Clin Cancer Res 3: 593-600, 1997.
- Mars W, Zarnegar R, Michalopoulos GK: "*Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA.*" Am J Pathol 143: 949-958, 1993.
- Mass RD, Sanders C, Charlene: "*The Concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the herceptin pivotal trials.*" ASCO 2000: Abstract 291.
- McGuire WL.: "*Breast Cancer Prognostic Factors: Evaluation Guidelines.*" J.nat.Cancer Inst. 83: 154-155, 1991.
- McGuire WL, Clark GM: "*Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer.*" N Engl J Med 326: 1756-1761, 1992.

Mignatti P, Rifkin DB: "*Biology and biochemistry of proteases in tumor invasion.*" *Physiol Rev* 73: 161-195, 1991.

Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CL, Stratton-Thomas JR, Shuman MA, Rosenberg S: "*Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary growth in syngeneic mice.*" *Cancer Res* 56: 2428-2433, 1996.

Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, Henderson IC: "*C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer.*" *N Engl J Med* 330: 1260-1266, 1994.

O'Reilly SM, Barnes DM, Campeljohann RS, Bartkova J, Gregory WM, Richards MA: "*The relation between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer.*" *Br J Cancer* 63: 444-446, 1991.

Odekon LE, Sato Y, Rifkin DB: "*Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity.*" *J Cell Physiol* 150: 258-263, 1992.

Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, Gapany S, Barker EA, Preisler H: "*C-myc, c-erbB-2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and non-invasive breast carcinoma.*" *Cancer Res* 52: 2597-2602, 1992.

Penault-Llorca F, Adelaide J, Houvenaeghel G, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J: "*Optimisation of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer : impact of fixation.*" *J Pathol* 173: 65-75, 1994.

Pollanen J, Stephens RW, Vaheri A: "*Direct plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells.*" *Adv Cancer Res* 57: 273-328, 1991.

Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove J, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, Paterson M, Slamon DJ: "*Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue qualification by computerised image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease.*" *Cancer Res* 53: 4960-4970, 1993.

Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ: "*Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression.*" *Cancer Res* 54: 2771-2777, 1994.

Press MJ, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ: "*HER-2/ gene amplification characterised by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas.*" *J Clin Oncol* 15: 2894-2904, 1997.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: bearbeitet von der Wörterbuch- Redaktion des Verlages unter der Leitung von Helmuth Hildebrandt.- 258., neu bearbeitete Auflage- Berlin: de Gryter, 1998.

Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM: "The prognostic value of *c-erbB-2* in primary breast carcinomas: a study on 942 cases." *Breast Cancer Res Treat* 35: 283-291, 1995.

Revillon F, Bonnetterre J, Peyrat JP: Review: "ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance." *Eur J Cancer* 34: 791-808, 1998.

Riben MW, Malfetano JH, Nazeer T, Muraca PJ, Ambros RA, Ross SJ: "Identification of HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridisation in stage I endometrial carcinoma." *Modern Pathology* 10: 823-831, 1997.

Roche Lexikon Medizin: bearbeitet von der Lexikon-Redaktion des Verlages Urban & Schwarzenberg unter der Leitung von Dr. med. Nobert Boss.- 2., neu bearbeitete Auflage. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg.

Ross Jeffrey S, Christine E. Sheehan, Alida M. Hayner-Buchan, Robert A. Ambros, Bhaskar V. S. Kallakury, Ronald P. Kaufman, Jr., Hugh A. G. Fisher, Matthew D. Rifkin, Patrick J. Muraca.: "Prognostic significance of HER-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridisation of prostate carcinoma." *Cancer* 79: 2162-70, 1997.

Ross Jeffrey S, Fletcher JA: "The Her-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy." *Oncologist* 3: 237-252, 1998.

Riede Ursus-Nikolaus, Schaefer Hans-Eckart: „Allgemeine und spezielle Pathologie.“ Georg Thieme Verlag, 4.Auflage, Stuttgart 1995.

Schmitt M, Jänicke F, Graeff H: "Proteases, matrix degradation & tumor cell spread." *Fibrinolysis* 6: 1-170, 1992a.

Schmitt M, Jänicke F, Graeff H: "Tumor associated proteases." *Fibrinolysis* 6, Suppl. 4: 3-26, 1992b.

Schmitt M, Wilhelm O, Jänicke F, Magdolen V, Reuning U, Ohi H, Moniwa N, Kobayashi H, Weidle U, Graeff H: "Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (CD87). A new target in tumor invasion and metastasis." *J Obstet Gynaecol* 21: 151-165, 1995.

Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Höfler H, Jänicke F, Graeff H: "Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy." *Thrombosis and Haemostasis* 78 (1): 285-296, 1997a.

Schmitt M, Thomssen C, Ulm K, Seiderer A, Harbeck N, Höfler H, Jänicke F, Graeff H: "Time-varying prognostic impact of tumor biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer." *Br J Cancer* 76:306-311, 1997b.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin W, Ullrich A, McGuire W: "Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene." *Science* 235: 177-182, 1987a.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Hott JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MI: "*Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.*" Science 244: 707-712, 1987b.

Slamon DJ, Clark GM: "*Amplification of C-ERB-B2 and aggressive breast tumors?*" Science 240: 1795-1798, 1988.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Baselga J, Norton L. "*Addition of Herceptin (Humanized anti-HER-2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: A randomized, multinational controlled phase III trial.*" ASCO Proc: 377, 1998.

Spyratos F, Martin P-M, Hacene K, Romain S, Andrieu C, Ferrero-Pous M, Deytieux S, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Brunet M: "*Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer.*" J Natl Cancer Inst 84: 1266-1272, 1992.

Stefansson S, Lawrence DA: "*The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha_v\beta_3$ binding to vitronectin.*" Nature 383: 441-443, 1996.

Tumorzentrum München (Sauer H. ed.). Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Herausgeber Tumorzentrum München, 6.Auflage 1996.

Tumorzentrum München (Sauer H. ed.). Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Herausgeber: Tumorzentrum München (korrigierte und ergänzte Nachdruck 1998).

Van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, Berns E, van der Burg ME, Green J, Vergote I: "*A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Co-operative Group.*" J Clin Pathol 50: 801-804, 1997.

Van Roy F, Märel M: "*Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility.*" Trends Cell Biol 2: 163-169, 1992.

Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA: "*Regulation of integrin function by the urokinase receptor.*" Science 273: 1551-1555, 1996.

Zujewski J, Liu ET. "The 1998 St.Gallen's Consensus Conference: an assessment." J Natl Cancer Inst 1998; 90:1587-9.

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Übergang normaler Zellen in Tumorzellen <i>nach dem Roche Lexikon Medizin</i>	13
Abb.2	Chromosom 17q	16
Abb.3	Graphische Darstellung der verschiedenen biologischen Funktionen von uPA und PAI-1 (<i>Harbeck, 1998</i>)	21
Abb.4	HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation bestimmt mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) im nodal-negativen Mammakarzinomgewebe	26
Abb.5	HER-2/ <i>neu</i> Protein-Überexpression bestimmt mittels der Immunhistochemie durch Anwendung des monoklonalen Mausantikörper Ab-3 (Oncogene Science, MA) im nodal-negativen Mammakarzinomgewebe	29
Abb.6	CART-Analyse für die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom, durchgeführt nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 84 Monaten (uPA, PAI-1, HER-2/ <i>neu</i> AMP)	35
Abb.7	CART-Analyse der rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom, durchgeführt nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 84 Monaten (uPA, PAI-1, HER-2/ <i>neu</i> AMP, Grading)	36
Abb.8a	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation (FISH) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	38
Abb.8b	Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation (FISH) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	38
Abb.9a	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von HER-2/ <i>neu</i> Protein-Überexpression (IHC) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	39

Abb.9b	Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von HER-2/ <i>neu</i> Protein-Überexpression (IHC) bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	39
Abb.10	Das mit der HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation (FISH) assoziierte Relative Rezidivrisiko innerhalb der Subgruppen der nodal-negativen Mammakarzinompatientinnen, die durch die etablierten Prognosefaktoren definiert wurden	40
Abb.11a	Kombination von uPA/PAI-1 und HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation (FISH) und deren Einfluss auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom	41
Abb.11b	Kombination von uPA/PAI-1 und HER-2/ <i>neu</i> Gen-Amplifikation (FISH) und deren Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit (OS) im nodal-negativen Mammakarzinom	41
Abb.12	Einfluss der Kombination uPA/PAI-1 (beide Faktoren unterhalb des Cut-Off im Vergleich zu einem bzw. beiden Faktoren oberhalb des Cut-Off) auf die rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) im nodal-negativen Mammakarzinom.	42
Abb.13a	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von uPA bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	43
Abb.13b	Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von uPA bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	43
Abb.14a	Rezidivfreie Überlebenszeit (DFS) in Abhängigkeit von PAI-1 bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	44
Abb.14b	Gesamtüberlebenszeit (OS) in Abhängigkeit von PAI-1 bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	44

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1	Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom (<i>Tumorzentrum München, 1998</i>)	11
Tab.2	Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren (modifiziert nach <i>McGuire, 1991 und Graeff, 1997</i>)	12
Tab.3	Die <i>cerb</i> -Onkogen-Familie (<i>Ross et al., 1998</i>)	15
Tab.4	Unterschiede zwischen dem <i>HER-2/neu</i> -Gen und dem <i>EGFR</i> -Gen	15
Tab.5	Verteilung der histomorphologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarziom (n=112)	24
Tab.6	Zusammenfassung der univariaten (Kaplan-Meier) und multivariaten Analysen (Cox-Modell) für die rezidivfreie- und die Gesamtüberlebenszeit bei nodal-negativen Patientinnen mit primärem Mammakarzinom	37
Tab.7	Vergleich der IHC- und FISH-Methode zur Darstellung von Anomalien des <i>HER-2/neu</i> Gens und Proteins (<i>Ross et al., 1998</i>)	47
Tab.8	Vergleich verschiedener Publikationen zur Bedeutung von <i>HER-2/neu</i> bei Patientinnen mit nodal-negativem Mammakarzinom	50

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn **Prof. Dr. med. H. Graeff** für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seiner Klinik durchzuführen und Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Schmitt** für die Unterstützung seitens der klinischen Forschungsgruppe der Frauenklinik.

Meiner Doktormutter, Frau **Priv. Doz. Dr. med. Nadia Harbeck** für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, für die engagierte wissenschaftliche Betreuung, insbesondere für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge bei der Niederschrift und für die gute Zusammenarbeit.

Herrn **Prof. W. Nathrath** und Herrn **Dr. med. P. Dettmar** für die Durchführung der immunohistochemischen Färbungen.

Herrn **Prof. Dr. rer. nat. K. Ulm** und seinen Mitarbeitern aus dem IMSE, Frau **Dipl.-Stat. U. Berger**, Herrn **C. Linse**, insbesondere Frau **Juliane Schäfer** für die statistische Auswertung.

Frau **Dr. med. Ç. Hilderscheid** für die stetige Unterstützung in jeder Weise während des gesamten Studiums.

Herrn **Peter Stadie** für seine wertvollen Anregungen bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Schliesslich möchte ich meinen Eltern, **Gülsüm** und **Ali Yurdseven**, sowie meinen Schwestern **Suzan** und **Fatma**, für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren unerschütterlichen Beistand während des gesamten Studiums danken.

10 Lebenslauf

Suna Yurdseven

Familienstand: ledig

24.02.1975 München als Tochter von Gülsüm Yurdseven (geb. Ceylan) und Ali Yurdseven

1981 – 1985 Grundschule in der Kirchenstrasse, München

1985 – 1994 Isar-Gymnasium, München

01.07.1994 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

1994 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

2000 – 2001 Praktisches Jahr:
Innere Medizin/ Städtisches Krankenhaus München Schwabing
Chirurgie/ Dokuz Eylül Üniverstesı Izmir, Türkei
Gynäkologie/ I. Frauenklinik der Universität München

26.04.2001 III. Staatsexamen in Humanmedizin