

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
- Hämatologie/ Onkologie -
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll)
des Fachbereichs Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**HER-2 Expression bei kolorektalen Tumoren:
Korrelation der Expression des membrangebundenen HER-2
mit der Serumkonzentration des löslichen Antigens und patienten- bzw.
tumorspezifischen Parametern.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

verteidigt am 17.10.2005
Gutachter: Prof. Dr. Schmoll
Prof. Dr. Holzhausen
PD Dr. Ridwelski

von Matthias Benecke

geboren am 16. 11. 1977 in Dessau

urn:nbn:de:gbv:3-000009117

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009117>]

Diese Arbeit ist meinen Eltern
Margit und Hermann gewidmet.

Kurzreferat

In Deutschland gehört das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Die Diagnose gestaltet sich aufgrund erst sehr spät einsetzender Symptome zudem oft sehr schwierig.

Beim Mammakarzinom ist bereits eine Vielzahl von Fakten im Zusammenhang mit dem HER-2/neu-Onkogen bekannt. So gehört der HER-2 Status im Rahmen der Prognoseabschätzung bei Brustkrebs-Patienten zu den wichtigsten Parametern. Weiterhin wird das Onkogenprodukt (HER-2 Rezeptor) als Target für eine spezifische Antikörpertherapie genutzt.

Der Zusammenhang zwischen HER-2/neu Onkogen und dem kolorektalen Karzinom bleibt bis dato jedoch weitestgehend ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die tumorbiologische Relevanz und die Bedeutung des HER-2 Status als prognostischer Faktor beim kolorektalen Karzinom, näher zu untersuchen. Korrelieren die HER-2 Gewebeexpressionen mit dem HER-2 Serumkonzentrationen und/oder anderen Tumor-/Patientenparametern? Wieviel Prozent der kolorektalen Karzinome zeigen eine Überexpression, und eignet sich HER-2 als Prognosefaktor?

Um diese Fragen zu klären, untersuchten wir die Seren von 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und bestimmten bei 74 von ihnen den HER-2 Gewebestatus im Primärtumor. Zur Sicherheit wurden die Gewebe-positiven Fälle zusätzlich noch auf DNA-Ebene mittels CISH abgeklärt.

Es stellte sich heraus, dass nur ein sehr geringer Anteil der Karzinome eine HER-2 Gewebeüberexpression zeigten. Jedoch korrelierten Serum-HER-2 Konzentrationen und Überlebenszeiten sehr eindrucksvoll miteinander. Somit scheint der HER-2 Rezeptor beim kolorektalen Karzinom aufgrund mangelnder Präsenz (im Gegensatz zum Mammakarzinom) nicht als Therapie-Target geeignet zu sein. Als Prognosefaktor und eventuell auch als Verlaufparameter könnte die routinemäßige Bestimmung der HER-2 Serumkonzentration zur Evaluierung bestehender Therapiekonzepte und Prognoseabschätzung beim kolorektalen Karzinom beitragen.

Benecke, Matthias: HER-2 Expression bei kolorektalen Tumoren: Korrelation der Expression des membrangebundenen HER-2 mit der Serumkonzentration des löslichen Antigens und patienten- bzw. tumorspezifischen Parametern. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 66 Seiten, 2003

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
1.1	1
1.1.1	1
1.1.2	1
1.1.3	5
1.2	5
1.2.1	5
1.2.2	7
1.3	10
1.4	11
2	12
2.1	12
2.1.1	12
2.2	12
2.3	13
2.4	13
2.4.1	13
2.4.2	14
2.4.3	15
2.5	17
2.5.1	17
2.5.2	18
2.5.3	18
2.6	21
2.6.1	21
2.6.2	21
2.6.3	22
2.7	23

3	ERGEBNISSE	24
3.1	Kontrollgruppe	24
3.2	Patientenkollektiv	24
3.2.1	HER-2 Serumkonzentrationen	24
3.2.1.1	Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Serumkonzentration (Übersicht)	26
3.2.1.2	Korrelation Metastasenstatus vs. HER-2 Serumkonzentration	26
3.2.1.3	Überlebenszeiten vs. HER-2 Serumkonzentration (Kaplan-Meier)	27
3.2.2	Überlebenszeiten in Abhängigkeit von anderen Parametern	29
3.2.3	HER-2 Gewebeexpressionen	31
3.2.3.1	Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Gewebeexpression (Übersicht)	33
3.2.3.2	CISH-Ergebnisse	34
3.2.3.3	Korrelation HER-2 Serumkonzentrationen vs. HER-2 Gewebe- expressionen	35
4	DISKUSSION	36
4.1.	Einordnung der Ergebnisse in derzeitigem Wissensstand zum HER-2/neu	36
4.2.	Serum-HER-2 Konzentrationen	37
4.3.	Gewebeexpressionen	39
4.4	Vergleich von Gewebe-HER-2 Expression und Serum-HER-2 Konzentration	40
4.5.	Korrelation mit anderen Parametern	40
5	ZUSAMMENFASSUNG	42
6	LITERATURVERZEICHNIS	43
7	THESEN	54

Anlagen

Publikationen von Ergebnissen der Arbeit

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

AP	alkalische Phosphatase
CA	Carbanhydrase
CEA	carcinomembryonales Antigen
CISH	Chromogen in-situ Hybridisierung
DAB	Diaminobenzidin
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxy-Ribo-Nukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Hb	Hämoglobin
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
HNU	human neu Units
IHC	Immunhistochemie
ISH	in-situ Hybridisierung
kD	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Fernmetastasen
M+	Fernmetastasen vorhanden
M-	keine Fernmetastasen vorhanden
N	Regionäre Lymphknoten
NDF	Neural Differentiation Factor
OPD	O-Phenylenediamine
R	Resektionsergebnis
RNA	Ribonukleinsäure
T	Primärtumor
TMB	Tetra-Methylbenzidine
U	Units
WHO	World Health Organization

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des HER-2 Rezeptors	8
Abbildung 2:	Schema des c-erbB2/c-neu Rapid Format ELISA	14
Abbildung 3:	Schema des DAKO Hercept-Test®	18
Abbildung 4:	<u>Boxplot</u> : Kontrollgruppe vs. Patientenkollektiv (88 kolorektale Karzinome) in Abhängigkeit vom HER-2 Serumlevel	25
Abbildung 5:	HER-2 Serumkonzentrationen aller 88 kolorektalen Karzinome	25
Abbildung 6:	<u>Kaplan-Meier Test</u> : 87 kolorektale Karzinome mit und ohne Fernmetastasen (M+ und M-) in Abhängigkeit von der HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)	28
Abbildung 7:	<u>Kaplan-Meier Test</u> : 79 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit von der HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)	28
Abbildung 8:	<u>Kaplan-Meier Test</u> : 68 kolorektale Karzinome mit und ohne Fernmetastasen (M+ und M-) in Abhängigkeit vom CEA (<50 ng/ml vs. ≥50 ng/ml)	29
Abbildung 9:	<u>Kaplan-Meier Test</u> : 62 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit vom CEA (<50 ng/ml vs. ≥50 ng/ml)	30
Abbildung 10:	<u>Kaplan-Meier Test</u> : 61 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit von LDH (<10 µmol/l vs. ≥10 µmol/l)	30
Abbildung 11:	Dako score 0 (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung	31
Abbildung 12:	Dako score 1+ (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung	31
Abbildung 13:	Dako score 2+ (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung	32
Abbildung 14:	Dako score 3+ (Magen-Karzinom) in 200facher Vergrößerung	32
Abbildung 15:	CISH negativ – 200 fache Vergrößerung	34
Abbildung 16:	CISH positiv – 200 fache Vergrößerung	34
Abbildung 17:	CISH positiv – 400 fache Vergrößerung	35

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Übersicht über die TNM-Klassifikation für Kolon- und Rektumkarzinome, die der Arbeit zugrunde liegt und dazugehörige 5-Jahresüberlebensraten	3
Tabelle 2:	Merkmale des Patientenkollektivs (Übersicht)	13
Tabelle 3:	Auswertungstabelle der Firma Dako (Hercept-Test®)	20
Tabelle 4:	Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Serumkonzentration	26
Tabelle 5:	<u>Fisher`s Exact Test</u> : Metastasenstatus (M+ vs. M-) gegen HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)	27
Tabelle 6:	Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Gewebeexpression	33
Tabelle 7:	<u>Fisher`s Exact Test</u> : HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU) gegen Gewebeexpression (Dako score 0 vs. Dako score 1/2)	36

1. EINLEITUNG

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Inzidenz

Das kolorektale Karzinom gehört nach dem Bronchial- und Prostatakarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom bei der Frau mit 9% aller Karzinome zu den am häufigsten auftretenden malignen Erkrankungen. Die Inzidenz ist deutlich höher als die Mortalitätsrate und steigt seit Jahren weiter an. Mit 55000-60000 Neuerkrankungen pro Jahr und etwa 30000 Todesfällen rangiert das kolorektale Karzinom jedoch an zweiter Stelle bei den Krebstodesursachen in Deutschland (1, 2). Demnach erkranken ca. 6% der Bevölkerung Deutschlands im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom.

Ätiologisch scheint es sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln. Bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms nehmen vor allem Essgewohnheiten (3-5), Konsum von Alkohol/Tabak (5), familiäre und hereditäre Faktoren Einfluss auf die Karzinogenese. Zu den Risikogruppen gehören weiterhin Patienten mit Colitis ulcerosa (5, 6), Morbus Crohn (5, 7) und einem früheren kolorektalen oder weiblichen Genital- oder Mammakarzinom.

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt bei einem Alter von 65 Jahren. Lediglich ca. 5% der Patienten sind jünger als 43 Jahre (5)

1.1.2 Pathologische Grundlagen, Prognosefaktoren und Therapieansätze

Zu 29% ist das kolorektale Karzinom im Colon ascendens, transversum oder descendens lokalisiert, gefolgt von Sigma (25%) und Rektum (23%). Die restlichen kolorektalen Karzinome sind im Zökum und rektosigmoidalen Übergang anzutreffen (1). Histologisch sind in der weit überwiegenden Mehrzahl Adenokarzinome zu finden (8).

Lokal breitet sich das kolorektale Karzinom durch die Schichten der Darmwand in das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe aus. Die Metastasierung erfolgt

zunächst über den lymphogenen Weg. Eine systemische Entfernung des Lymphabflussgebietes ist daher für eine mögliche kurative Operation, zur Vermeidung von Lokalrezidiven und sekundären Fernmetastasen, entscheidend (1, 5, 9). Ein Einbruch des Tumors in die Blutgefäße, was zu einer hämatogenen Streuung führt, ist erst zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung zu erwarten. Die Häufigkeitsverteilung der Metastasenlokalisierung unterscheidet sich beim Rektum- und Kolonkarzinom durch die unterschiedlichen Drainagegebiete. Das Kolonkarzinom metastasiert vor allem in Lymphknoten, Leber, Lungen und in das Skelett (1, 5). Beim Rektumkarzinom hingegen finden sich aufgrund eines zusätzlichen kavalen Metastasierungsweges vermehrt Lungenmetastasen (1, 10). Ein Metastasenbefall des Gehirns ist dagegen erst im weiteren Verlauf der Erkrankung zu erwarten. Patienten mit ausschließlichem Leberbefall haben eine günstigere Prognose (1).

Die Diagnose gestaltet sich oft schwierig und erfolgt meist erst im fortgeschrittenen Stadium. Etwa 30% aller Patienten weisen bei Diagnosestellung einen Lymphknotenbefall auf, weitere 25% haben Fernmetastasen. Der Grund hierfür liegt in dem oft langen symptomfreien Erkrankungsverlauf und in der Anwendung von unzureichend aussagekräftigen Screeningverfahren. Der Hämoccult-Test zum Beispiel erfasst nur fortgeschrittene Karzinome und besitzt eine Sensitivität von nur ca. 48-60% (5, 11). Den besten Effekt erreicht man, im Rahmen der sekundären Prävention, mit einer Sigmoidoskopie bzw. Koloskopie alle 5 bis 10 Jahre (1). Da es heute als gesichert gelten kann, dass die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome auf dem Boden eines vorbestehenden Adenoms entstehen (Polyp-Karzinom-Sequenz) (12), kann man endoskopisch entdeckte Polypen abtragen und somit die Entstehung eines Karzinoms schon im Vorfeld verhindern. Klinische Symptome wie Veränderung der Stuhlgewohnheiten (bis hin zu abwechselnder Obstipation und Durchfällen), Bauchschmerzen, Blutabgänge oder okkultes Blut im Stuhl, körperliche Schwäche und Schmerzen führen leider häufig erst spät zur Diagnose. Der weitere Krankheitsverlauf ist meist von der Metastasensymptomatik geprägt (1). Auch noch in den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass trotz verbesserter Screeningverfahren und apparativer Diagnostik die Prognose kolorektaler Karzinome nach wie vor schlecht ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für alle Tumorstadien zusammen im Durchschnitt nur bei ca. 58% (2) und ist entscheidend vom Tumorstadium abhängig.

<i>Stadium</i>	<i>TNM-Staging</i>			<i>5-J.-Überlebensraten (in %)</i>
Stadium 0	Tis	N0	M0	100
Stadium I	T1	N0	M0	100
	T2	N0	M0	85
Stadium II	T3	N0	M0	70
	T4	N0	M0	62
Stadium III	jedes T	N1	M0	60
	jedes T	N2, N3	M0	30
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	3

Tabelle 1: Übersicht über die TNM-Klassifikation für Kolon- und Rektumkarzinome, die der Arbeit zugrunde liegt und dazugehörige 5-Jahresüberlebensraten (13)

Folgende Prognosefaktoren sind beim kolorektalen Karzinom relevant:

1. Tumor-Ausbreitungsstadium (Staging)
2. Grading
3. Radikalität der Operation
4. Patientenspezifische Faktoren

zu 1)

Die Prognose hängt im wesentlichen von der Tumorausdehnung/Stadium nach dem System von Dukes oder dem TNM-System ab.

Eine starke Verschlechterung der Prognose zeigt sich, wenn der Primärtumor die Organgrenzen bereits durchbrochen hat, die umgebenden Lymphknoten infiltriert (Stadium III) und/oder fernmetastasiert ist (Stadium IV). Das Risiko eines loko-regionären Rezidivs erhöht sich hierbei von 8 auf 56% (14, 15).

zu 2)

Zur Definition des Differenzierungsgrades werden zytologische Kriterien (Kernatypien, Zellpolymorphien, Mitosezahl) unter dem Vergleich zum Normalgewebe herangezogen. In dieser Arbeit wird die Einteilung der WHO verwendet:

- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3 Schlecht differenziert
- G4 Undifferenziert
- GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

Der Differenzierungsgrad (Malignitätsgrad) verschlechtert mit steigender Entdifferenzierung die Prognose.

zu 3)

Das therapeutische Vorgehen richtet sich entscheidend nach der Ausdehnung und möglichen Mikrometastasen des Karzinoms. Die Operation steht hierbei im Vordergrund. Präoperativ sind ein genaues Staging und das Erkennen bzw. der Ausschluss von Fernmetastasen unerlässlich. Aufgrund der heute niedrigen Letalitätsraten, die auch bei alten Patienten noch unter 3% liegen, und guten Langzeitprognosen ist eine radikale Resektion inklusive Lymphadenektomie mit tumorfreien Schnitträndern (=R0-Resektion, En-bloc-Resektion) mit kurativem Ziel, vor allem bei frühen Tumorstadien in jedem Fall in Betracht zu ziehen. Durch R0-Resektion erreicht man heute eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80-85% beim Kolonkarzinom und 70-75% beim Rektumkarzinom im Stadium I und II (16). Im WHO Stadium III liegt diese ohne weiter medikamentöse (adjuvante) Therapie nur noch bei 27% (17). Auch bei bereits bestehender Fernmetastasierung kann unter palliativen Gesichtspunkten ein chirurgisches Vorgehen sinnvoll sein. Die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten steht hierbei neben der Lebensverlängerung im Vordergrund. Bei einer Resektion mit verbleibendem Residualtumor überleben die Patienten nur in 15% der Fälle die folgenden 5 Jahre (16). Durch zahlreiche große Studien abgesichert, wird beim Kolonkarzinom ab dem Stadium III eine adjuvante Chemotherapie und beim Rektumkarzinom ab dem Stadium II eine adjuvante Radio-/Chemotherapie eingesetzt (18). Verschiedene Mono- und Kombinationstherapien stehen hier zur Verfügung. Trotz der Verfügbarkeit dieser Therapieoptionen kann nach einer kurativen Operation, aufgrund möglicher Rezidive, nicht von einer unbedingten Heilung des Patienten ausgegangen werden (19). Staging, biologische Aggressivität des Tumors und die adjuvante (Radio-)/Chemotherapie haben ebenfalls entscheidend Einfluss auf die Langzeitprognose und eine mögliche Heilung.

zu 4)

Weiterhin können zahlreiche patientenspezifische Faktoren prognostisch relevant sein. Der Nachweis von verschiedenen molekulargenetischen Ereignissen (siehe Abschnitt „Genetische Aspekte“) und der Tumormarker CEA und CA19-9 (5) sind hierbei von Bedeutung. Aber auch Allgemeinzustand, Alter und psychische Faktoren (20) haben Einfluss auf die Prognose. Im metastasierten Stadium sind außerdem folgende Prognoseparameter von Bedeutung: Metastasenzahl und -lokalisation, Leukozytenzahl, alkalische Phosphatase und LDH im Blut des

Patienten, wobei erhöhte LDH, erhöhte alkalische Phosphatase und hohe Leukozytenzahlen (über 10000) für eine geringere Lebenserwartung sprechen (1).

1.1.3 Genetische Aspekte

In der Literatur findet man eine große Variationsbreite der Anteile von kolorektalen Tumoren, welche auf genetische Ursachen zurückzuführen sind. Die Angaben variieren zwischen 5-20% (21-23). Eine Vielzahl von Studien lieferten Erkenntnisse über Vererbungsmodelle (21, 22, 24), Krebsentstehung aus Adenomen (25) und genetische Mutationen, die zur Karzinomentstehung führen (12).

Hereditäre kolorektale Karzinome lassen sich in die familiäre Polyposis und in die nicht-polypösen Typen einteilen (23). Die Polyposis manifestiert sich gewöhnlich im frühen Alter (22). Hier sind vor allem die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die juvenile Polyposis, das Gardner-, Peutz-Jegher`s- und Turcot`s- Syndrom zu nennen (1, 21, 23). Diese Syndrome sind jedoch sehr selten und beanspruchen per se weniger als 0,5 % der kolorektalen Karzinome (1, 21-24). Der nicht-polypöse Typ ist als HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) oder Lynch-Syndrom (1, 24) bekannt. 10-15% aller kolorektalen Karzinome sind auf das Lynch-Syndrom zurückzuführen (1). Eine mismatch-repair Enzym-Mutation führt beim Lynch-Syndrom zu einem vermehrten Auftreten von Adenokarzinomen.

Von Bedeutung bei der genetisch-assoziierten Karzinomentstehung sind beim kolorektalen Karzinom Punktmutationen von N-ras, K-ras (5, 26, 27), myb, HER-2/neu (siehe unten) und c-myc (5). Weiterhin spielt die Inaktivierung der Suppressorgene p53 (auf dem Chromosom 17p53), DCC (auf dem Chromosom 18q21) oder des APC-Gens durch Allelverlust oder Mutationen eine Rolle (5, 12, 28).

1.2 Onkogene

1.2.1 Allgemeines

Wesentlicher Bestandteil der Karzinogenese ist die Veränderung des Zell-Genoms, was zu einer Transformation der Zelle führt. Diese genetischen Veränderungen werden als Mutationen bezeichnet.

Onkogene wurden ursprünglich in Viren gefunden und sind in der Lage, Zielzellen zu transformieren. In Analogie zu Onkogenen gibt es humane zelluläre Gene, die als Protoonkogene bezeichnet werden. Sie wirken entscheidend an der normalen Zellproliferation, Gewebedifferenzierung und Embryonalentwicklung mit und finden sich somit auch in nicht-malignen Zellen (29, 30). Die Aktivierung solcher Protoonkogene zu transformierenden Onkogenen spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese (31, 32). Als Gegenspieler dieser Protoonkogene existieren sogenannte Tumor-Suppressorgene (Antionkogene), welche die Karzinogenese supprimieren. Die Genprodukte der Protoonkogene und Tumorsuppressorgene stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht miteinander. Eine Aktivierung bzw. Hemmung dieser Gene kann somit in einer Krebsentstehung münden (28).

Ungefähr 100 Onkogene sind bis dato beschrieben (28). Die Aktivierung eines Protoonkogens ist auf verschiedenen Wegen möglich (32, 33):

virale Aktivierungsmechanismen:

1. insertionale Mutagenese (Einbau von in DNA umgeschriebener viraler RNA (durch Reverse Transkriptase) in die Wirtszelle)
2. Transduktion (Übertragung von zellulären Genen durch Retroviren)

nicht-virale Aktivierungsmechanismen:

1. Punktmutationen (Veränderungen einer DNA-Base durch exogene oder endogene Einflüsse)
2. Genamplifikationen (Produktion zusätzlicher Genkopien, die zu erhöhter Genexpression führen)
3. chromosomale Translokation (Chromosomensegment-Austausch oder -Verschiebung)

Die Überexpression solcher Onkogene und ihrer Genprodukte im Tumorgewebe und in den entsprechenden Seren setzt man nun schon seit einiger Zeit als Marker für Verlaufskontrollen bei Krebspatienten ein (34). Beim Mammakarzinom ist das ein wichtiger Parameter bei der Erkennung von okkulten Metastasen bzw. Rezidiven.

1.2.2 Das HER-2/neu-Onkogen (c-erbB-2)

Da dieses Protoonkogen von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isoliert wurde, existieren verschiedene Synonyme (HER-2/neu, NEU, c-erbB-2) (35-38).

NEU (HER-2/neu) wurde erstmals in Neuroglioblastoma der Ratte, die durch Ethylnitrosoharnstoff induziert wurden, identifiziert (38, 39).

Fukushige et al. konnten dann 1986 dieses Protoonkogen auf dem langen Arm des Chromosom 17 in der Bande 12 (17q12) lokalisieren (36, 40).

Als Translationsprodukt wurde ein transmembranöses 185 kD Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität, genannt p185, nachgewiesen (41-43). Dieses zeigt deutliche Homologie zum 170 kD epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (=p170), der durch das c-erbB-1 Protoonkogen synthetisiert wird (36-38, 44-46). Nicht nur maligne transformierte Zellen exprimieren p185 (46, 47); vielmehr konnten Gullick et al. bereits 1987 durchschnittlich ca. 100000 p185-Moleküle in normalen Zellen finden (48). In Homologie zum EGFR setzt sich das p185 aus drei Domänen zusammen (33, 36, 41, 43, 44, 49, 50):

1) Das **extrazelluläre** Fragment zeigt ca. 43% Homologie zum EGFR und enthält auch wie dieser zwei cysteinreiche Cluster (37, 43, 44). Mit einer Liganden-Bindungsstelle repräsentiert diese Domäne die Rezeptorfunktion des p185. Die Gruppe der Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR=HER-1, HER-2, HER-3, HER-4) sind in der Lage Homo- (z.B. HER-2/HER-2) oder Heterodimere (z.B. HER-2/EGFR, HER-2/HER-3, etc.) zu bilden. Dadurch kann es zu einer Aktivierung eines benachbarten, kooperierenden Rezeptors kommen (51-53). 1990 konnte von Lupu et al. ein spezifischer Ligand für das c-erbB-2-Protein und den EGFR nachgewiesen werden (54). Er wurde NDF (neural differentiation factor; Synonyme: Neuregulin, Heregulin) genannt. Später sollte sich jedoch herausstellen, dass der Ligand nicht *direkt* den HER-2-Rezeptor aktiviert, sondern vielmehr über Heterodimere (HER-2/HER-3, HER-2/HER-4 etc.) die Phosphorylierung von p185 bewirkt (53, 55, 56). Bis dato ist kein direkter Ligand für das HER-2 Protein bekannt – alle bekannten Peptide wirken über die Heterodimerisierung mit anderen Wachstumsfaktoren. Hierdurch wird die zentrale Rolle des HER-2-Rezeptors innerhalb der EGF-R/ErbB-Familie deutlich und ist eine mögliche Erklärung für sein hohes transformierendes Potential (53, 56, 57).

Interessanterweise scheint das Heterodimer HER-2/HER-4 eine besondere Rolle beim fortgeschrittenen Stadium der Karzinogenese zu spielen und die gleichzeitige Überexpression beider Proteine für eine schlechtere Prognose zu sprechen (58).

2) Ein **transmembranöses** Zwischensegment stellt einen hydrophoben „Anker“ in der Zellmembran dar. Eine Punktmutation oder Genamplifikation im Bereich dieser Transmembrandomäne führt zu einer Aktivierung des c-erbB-2-Protoonkogens und resultiert in einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität (42, 59). Darin liegt wahrscheinlich der Einfluss auf die Kanzerogenese begründet.

3) C-terminal befindet sich die **intrazelluläre** Domäne des p185. Eine weitere Untergliederung in einen Teil mit Tyrosinkinaseaktivität und in ein carboxyterminales Ende ist hier sinnvoll. In der Aminosäuresequenz für die Tyrosin-kinasedomäne konnte eine Homologie zu p170 (EGFR) von ca. 82% (37, 44, 55) und für den carboxyterminalen Bereich nur 33% (55) nachgewiesen werden.

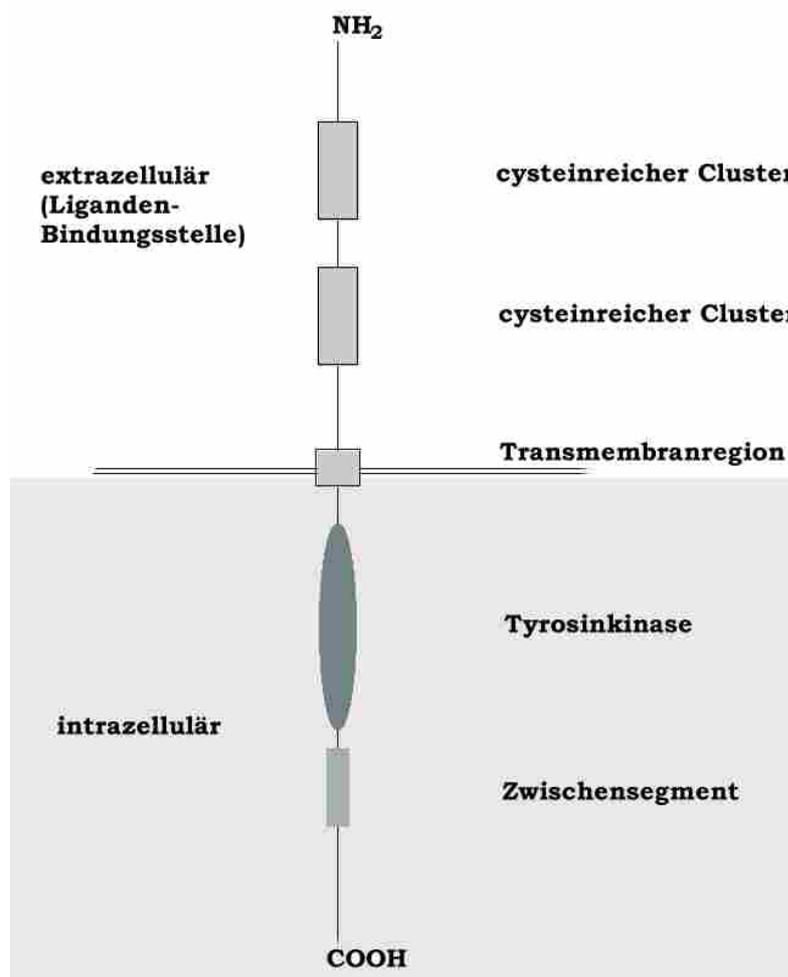


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HER-2 Rezeptors

Bereits 1989 entdeckten Hayes et al. in menschlichem Serum und in Überständen von Zellreihen durch Western-Blot-Methoden ein ca. 100 kD-Protein (60). Dieses Molekül konnte dann, aufgrund seiner Affinität zum anti-HER-2 Antikörper, als lösliches HER-2 Fragment (Shed-Antigen) identifiziert werden (61-64). Die Abspaltung dieses Fragments geht vermutlich auf die Wirkung spezifischer

Proteasen zurück (50, 65). Eine endgültige Klärung der (patho)physiologischen Relevanz dieses Moleküls für den Krankheitsverlauf und dessen Einfluss auf HER-2 gerichtete therapeutische Konzepte steht noch aus (62, 66). Jedoch deuten einige Studien auf eine Nutzbarkeit des löslichen HER-2 Fragment als prognostischen Faktor hin (63, 67-72).

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Arbeitsgruppen zeigen, dass zumindest für das Mammakarzinom eine HER-2 Überexpression bzw. eine HER-2 Amplifikation mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (47, 49, 50, 73-88). Bei etwa 15-25% der Mammakarzinome konnte eine HER-2 Überexpression nachgewiesen werden (49, 50, 73, 81, 83, 85-90). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen Amplifikation und Überexpression gezeigt (73, 89, 91-93). Eine weitere interessante Erkenntnis lieferten Lichtenstein et al. 1990. Anhand von Zellkulturen des Ovarialkarzinoms konnte die Arbeitsgruppe eine Korrelation zwischen HER-2 Überexpression und einer gesteigerten Resistenz gegenüber zytotoxischen Effekten des Tumornekrosefaktor und lymphokinaktivierten Killerzellen nachweisen (94). 1998 konnte Sleijfer et al. anhand von (kleinzelligen)-Lungenkarzinom Zellreihen ähnliche Ergebnisse aufzeigen (95). Dieser Ansatz lässt Raum für Spekulationen zur Tumorbiologie von HER-2 überexprimierenden Karzinomen.

Von großem klinisch-onkologischen Interesse im Zusammenhang mit HER-2 überexprimierenden Mammakarzinomen ist seit den letzten Jahren die Entwicklung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin® =rhuMA4D5) gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2 Rezeptors geworden (50, 57, 87, 88, 96, 97). Da auch eine Resistenz von HER-2 überexprimierenden Tumoren gegenüber bestimmten Chemotherapeutika diskutiert wird (88, 98-100), bietet sich dadurch die Möglichkeit, die HER-2 überexprimierenden Zellen mit diesen Antikörpern ganz spezifisch einer Chemotherapie zugänglich zu machen. Beim Mammakarzinom konnte bereits in randomisierten klinischen Studien eine signifikant verlängerte Überlebenszeit für Patientinnen mit HER-2 überexprimierenden Tumoren, unter Anwendung von Chemotherapie + Trastuzumab, nachgewiesen werden (87, 96). Besonders Platinverbindungen und Trastuzumab in Kombination zeigen einen deutlich synergistischen Effekt. Eine mögliche Erklärung ist hier die Hemmung der DNA-Reparaturmechanismen durch die HER-2-Rezeptor Blockierung, wodurch es durch die Platinverbindungen-induzierten DNA-Schäden zu einer Potenzierung des zytotoxischen Potentials kommt (87, 101, 102).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nach dem Stand der Forschung eine HER-2 Überexpression bei ca. 10-15% aller Magenkarzinome (11, 30, 103-113), ca. 10-15% aller kolorektalen Karzinome (114-117) bis zu 60% aller Pankreaskarzinome (118-120) und sehr gering auch bei Harnblasen- (121, 122), Speicheldrüsen- (37), Lungen- (123-126), und Prostatakarzinomen (127) zu erwarten. Die Datenlage zur anti-HER-2 gerichteten Therapie solcher Tumoren ist bis heute jedoch noch weitgehend unklar.

1.3 Bestimmungsmethoden zum Nachweis einer HER-2 Überexpression

Zur Bestimmung einer HER-2 Überexpression lassen sich verschiedene Detektionssysteme verwenden. Zum einen existieren Nachweismethoden, die auf der Interaktion von spezifischen Antikörpern mit der extrazellulären Domäne des HER-2 Rezeptors basieren. Grundlage hierfür war die Entdeckung von Antikörpern in mit Brustkrebs-Zellkultur-Extrakten immunisierten Mäusen (54, 102). Auf dieser Basis lässt sich mittels Immunhistochemie (IHC) eine HER-2 Proteinüberexpression in Geweben und mittels ELISA-Tests (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) die Konzentration des löslichen HER-2 Moleküls (Shed-Antigen) im Serum bestimmen. Zum anderen ist es möglich, eine HER-2/neu Amplifikation auf DNA-Ebene mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) bzw. Chromogene-in-situ Hybridisierung (CISH) nachzuweisen.

Bei den auf IHC-Basis arbeitenden Kitsystemen fand der auch in dieser Arbeit verwendete Hercept-Test® die breiteste Anwendung. Es gab allerdings Diskussionen über die Sensitivität und Spezifität dieser Tests (128, 129). Dies betrifft vor allem die sog. 2+ positiven Tumore (auf einer Skala von 0 bis 3+). Daher wird in dieser Arbeit, wie auch nach zunehmendem Konsens empfohlen, bei den 2+ positiven Tumoren eine HER-2 Überexpression zusätzlich auf DNA-Ebene (mittels CISH-Analyse) nachgewiesen.

Eine Vielzahl von Studien bediente sich bereits der ELISA-Technik, um erhöhte HER-2 Serumkonzentrationen bei Mammakarziom-Patientinnen nachzuweisen. Da die Detektionssysteme zum Nachweis einer HER-2 Amplifikation bzw. Gewebe-HER-2 Expression sehr aufwendig sind, könnte die ELISA-Technik hier mögliche Ansätze zum Nachweis einer HER-2 Überexpression bieten. Beim Mammakarzinom und später auch bei anderen Karzinomen konnte somit eine Korrelationen von Serum-HER-2- Konzentrationen zu Gewebe-HER-2 Expression, Metastasierung, Rezidiv-auftreten und anderen klinischen Parametern nachgewiesen werden (50, 70, 113, 130-133). Allerdings gibt es auch einige Berichte, in denen kein Zusammenhang

zwischen erhöhten Serum HER-2 Konzentrationen und klinischen Parametern bzw. klinischen Verläufen gefunden wurde (134). Die Autoren dieser Studien machten jedoch zu kleine Patientenzahlen oder Probleme bei der experimentellen Durchführung möglicherweise dafür verantwortlich.

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die tumorbiologische Relevanz von HER-2 beim kolorektalen Karzinom und dessen Bedeutung als prognostischer Faktor zu klären. Im Hinblick auf die Nutzung des HER-2 bei Mammakarzinomen, als therapeutisches Target für eine anti-HER-2 gerichtete Therapie, ist diese Arbeit auch als Ansatz für eine mögliche Therapie mit HER-2-Antikörpern bei kolorektalen Karzinomen zu sehen.

Die HER-2 Expression der kolorektalen Karzinome wird prospektiv analysiert, um die Ergebnisse dann mit den Serumkonzentrationen des löslichen HER-2 und klinischen Parametern zu korrelieren.

Im Einzelnen soll folgendes geklärt werden:

- Wie hoch ist die Expression von HER-2 in kolorektalen Tumoren und in wieviel Prozent der Fälle lässt sich eine HER-2-Überexpression darstellen?
- Korreliert die HER-2 Expression im Gewebe mit der Serumkonzentration des löslichen HER-2-Fragments?
- Kann eine Korrelation zu folgenden Tumorparametern nachgewiesen werden?
 - Patientenalter bei Entnahme
 - Geschlecht
 - Staging
 - Grading
 - Tumormarker: CEA, CA 19-9
 - Laborparameter: LDH, Hb, Leukozyten, Thrombozyten, Kreatinin, CRP, AP, Bilirubin
 - Therapie
 - Metastasen
 - Überlebenszeit/Prognose

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Gebrauchswaren

Als Gebrauchswaren wurden zum größten Teil Materialien der Firmen Eppendorf und Sarstedt benutzt. Es wurden ausschließlich Einmal-Materialien verwendet.

2.2 Patientenkollektiv

Von Februar 2000 bis April 2001 wurden Serumproben von 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen der Hämatologisch-Onkologischen Ambulanz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zusammengetragen. Auswahlkriterien für die Patienten waren lediglich die Möglichkeit, die Tumorparameter weitgehend komplett erheben zu können. 74 der in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben (Proben aus Tumorresektaten des Primärtumors) der o. g. Patienten wurde vom Pathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. H. -J. Holzhausen) für die immunhistochemische Untersuchung bereitgestellt. Die Tumorgewebeproben von Patienten, die sich von anderen Instituten in der Hämatologischen-Onkologischen-Ambulanz vorstellten, wurden von den entsprechenden Instituten zur Verfügung gestellt.

Die Ermittlung der Tumorparameter (Tumormarker, Grading, TNM-Staging, patientenspezifische Daten etc.) erfolgte retrospektiv aus den Patientenakten bzw. der elektronischen Datenbank des Pathologischen Institutes.

Im Verlauf der 14 Monate wurden von allen 88 Patienten in den Serumproben die c-erbB-2-Protein-Konzentration mittels eines ELISA gemessen. Parallel hierzu wurden folgende Laborparameter mitbestimmt:

- Kreatinin
- Bilirubin gesamt
- LDH
- Alkalische Phosphatase
- CRP
- Thrombozyten
- Leukozyten

Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs veranschaulicht die folgende Tabelle:

Anzahl	88
männlich / weiblich	52 / 36
medianes Alter	62 (32-79) Jahre
Kolon / Rektum	54 / 34
Fernmetastasierung	90%
mediale Anzahl der Metastasen	2 (0-5)
Lebermetastasen	67%
laufende Chemotherapie	66%

Tabelle 2: Merkmale des Patientenkollektivs (Übersicht)

2.3 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten Serumproben von 20 gesunden Angestellten (10 männlich, 10 weiblich) der Hämatologisch/Onkologischen Ambulanz. Die entsprechenden Laborparameter wurden hierbei mit erfasst.

Gewebe aus der Kontrollgruppe stand nicht zur Verfügung. Keine der Kontrollen hatte eine Tumorerkrankung oder eine chronische Darmerkrankung.

2.4 ELISA zur Bestimmung der HER-2-Serumkonzentrationen

2.4.1 Testprinzip

Bei dem hier angewandten Verfahren handelt es sich um eine Sandwich-ELISA der Firma Oncogene Research Products. Der monoklonale Antikörper richtet sich dabei gegen das 100 kD Fragment (extrazelluläre Domäne im Serum) des c-erbB2 Moleküls.

Nach Inkubation der Proben in vorbeschichteten Wells erfolgte eine Bindung mit einem weiteren polyklonalen anti-c-erbB2 Antikörper. Der Nachweis wurde mit einem Peroxidase-konjugierten weiteren Antikörper durchgeführt. Die Messung erfolgte schließlich über die Peroxidase-bedingten Farbstoffumsetzungen mittels eines Photometers. Anhand der Farbintensität errechnete sich mit Hilfe der Eichkurve die zugrunde liegende Konzentration des 100 kD c-erbB2 Molekülfragments.

Da die Tests über einen Zeitraum von ca. 1 Jahr durchgeführt wurden, änderte die Firma Oncogene Research Products den Testablauf der einzelnen Kits in diesem Zeitraum geringfügig. So arbeiteten die ersten Kits auf der Basis von einem Maus anti-c-erbB2 Antikörper als Capture-Antikörper und einem Kaninchen anti-c-erbB2 Antikörper als Detektor-Antikörper. Die letzten Tests hingegen verwenden zwei monoklonale Maus-Antikörper. Aufgrund der standardisierten Form des Verfahrens unter Verwendung einer jeweiligen Eichkurve bleiben die Ergebnisse der angewandten ELISA untereinander jedoch vergleichbar.

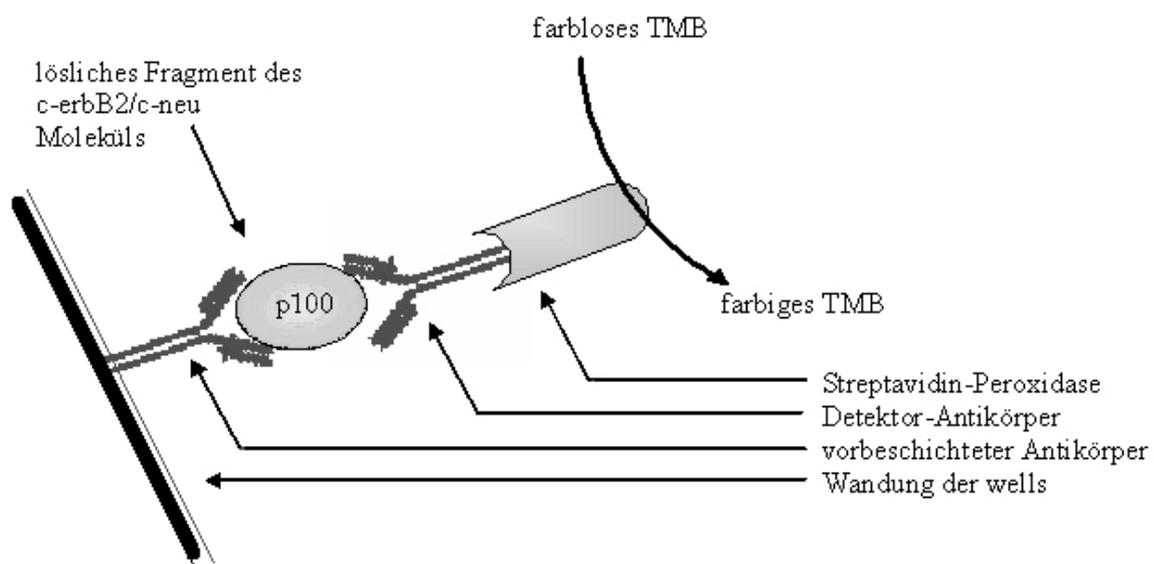


Abbildung 2: Schema des c-erbB2/c-neu Rapid Format ELISA

2.4.2 Substanzen

Alle vorgefertigten Reagenzien wurden dem c-erbB2/c-neu Rapid Format ELISA (QIA 10 über die Firma DIANOVA) entnommen.

6 Standardlösungen: c-erbB2/c-neu Protein (Verdünnungsreihe: 1200, 600, 300, 150, 75, 0 HNU/ml)

Waschpuffer 1:20 (50 ml Waschpuffer + 950 ml destilliertes Wasser)

Konjugatlösung 500X (Streptavidin-Peroxidase): 24 µl Konjugat + 12 ml Konjugatpuffer

c-erbB2/c-neu Antikörper (vorbeschichtet auf Mikrotiterplatte in 96 wells)

Detektor Antikörper: monoklonaler anti-human c-erbB2/c-neu Antikörper

Substratlösung: Tetra-Methylbenzidine (TMB)

Stopplösung: 2,5N Sulfuric-Säure
Aqua dest.

2.4.3 Durchführung

Probengewinnung/-aufarbeitung

1. Die Blutabnahme erfolgte im Wege der Vorstellung der Patienten in der Hämatologisch-Onkologischen Ambulanz der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg.
2. Innerhalb der nächsten 4 Stunden (Aufbewahrung bei Zimmertemperatur) wurden die Proben bei 3500 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert.
3. Durch Abpipettieren der Proben erfolgte das Einfüllen der Seren zu je 500µl in Tubes. Bis zur Weiterverarbeitung der Serumproben wurden diese gesammelt und bei -80°C gelagert.

ELISA-Durchführung

1. Die Serumproben wurden für 10 Minuten bei 37°C aufgetaut und wie alle anderen Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht.
2. Nach Herstellung aller benötigten Reagenzien (siehe oben) erfolgte eine Verdünnung der Serumproben mit gebrauchsfertiger Sample Diluent 1:20 (20µl Serum+380µl Sample Diluent).
3. *Während des ersten Inkubationsschritts bindet das lösliche Fragment des c-erbB2 Moleküls an den Capture Antikörper, der vorgefertigt an der Wand der Mikrotiterplatte haftet:*
100µl Standard bzw. 100µl vorverdünnte Serumprobe (siehe oben) wurden in je zwei Wells (Doppelbestimmung) einpipettiert. Nach verschließen der Platte erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.
4. *In einem zweiten Inkubationsschritt bindet der anti-c-erbB2 Antikörper an das an den Capture-Antikörper gebundene p185-Fragment:*
Nach 6 Waschgängen (300µl pro Well) mit dem vorbereiteten Waschpuffer (siehe oben) wurde pro Well 100µl Detektor-Antikörper hinzupipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur.
5. *Im nächsten Schritt wird der Detektor Antikörper von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Streptavidin gebunden, welches die Umwandlung des farblosen Substrates Tetra-Methylbenzidine in eine farbige Lösung katalysiert:*

Nach 6 Waschgängen (300µl pro Well) mit dem vorbereiteten Waschpuffer (siehe oben) wurde pro Well 100µl Konjugatlösung (Streptavidin-Peroxidase) pipettiert und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in verschlossener Platte inkubiert.

6. Nach einem weiteren Waschgang (6 mal 300µl pro Well) wurde einmal pro Well mit 100µl destilliertem Wasser gewaschen.
7. Nach Zugabe von 100µl Substratlösung (Tetra-Methylbenzidine) pro Well erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln in verschlossener Platte für weitere 30 Minuten.
8. *Mit Zugabe einer Stopplösung (2,5N Sulfuric-Säure) wird der Farbumwandlungsprozess des Substrates blockiert und bewirkt zugleich einen gelblichen Farbumschwung:*
Pro Well wurden 100µl Stopplösung einpipettiert.
9. Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung erfolgte die Absorptionsmessung der Extinktion bei 450nm (Referenzwellenlänge 620nm) mittels Photometer (anthos reader 2001, anthos Mikrosysteme GmbH Krefeld).
Jetzt wurde mit Hilfe einer Software (WinRead V.2.3) eine Eichkurve (Kurvenart: Punkt zu Punkt) erstellt, indem die Standardkonzentrationen (in HNU/ml) linear auf der X-Achse und die Standardextinktionen linear auf der Y-Achse aufgetragen wurden. Mit Hilfe dieser Eichkurve erfolgt schließlich das Ablesen der Serumkonzentrationen durch die jeweiligen Absorptionswerte.

Abweichungen der ersten ELISA-Tests (Januar 2000, April bzw. Juli 2000):

- a) Im gelieferten Kit waren bereits 6 separat verdünnte Standards enthalten (Konzentration: 120, 90, 60, 30, 10, 0 HNU/ml)
- b) Die Substratgebrauchslösung wurde aus einer OPD-Tablette (O-Phenylenediamine) pro 4 ml Substratverdünner (0,1M Citratpuffer und 0.01% H₂O₂) hergestellt.
- c) Konjugat-Gebrauchslösung wurde aus Konjugatkonzentrat (Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper) und Konjugatpuffer hergestellt.

Abweichung in Schritt 3) Vor dem Einpipettieren von Standards bzw. Serumproben wurde pro Well 10µl normales Mausserum hinzugegeben.

Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Abweichung in Schritt 6) Es erfolgte kein Waschgang mit destilliertem Wasser.

Abweichung in Schritt 7) Die Inkubationsdauer für die Substratlösung betrug eine Stunde statt 30 Minuten.

Für die Durchführung des ELISA im April bzw. Juli 2000 stand das Substrat (Tetra-Methylbenzidine) der Firma Oncogene Research Products bereits gebrauchsfertig zur Verfügung.

Die Absorptionsmessung erfolgte bei 492nm (620nm Referenzwellenlänge). Bei den ELISA im April bzw. Juli 2000 wurde jedoch bereits mit 450nm (Referenzbereich 620nm) gemessen.

Als Eichkurve wurde eine Cubic Spline-Kurve benutzt. Ein Nullstandard (=Blank) wurde hierbei von allen Messwerten subtrahiert.

2.5 Immunhistochemie – Gewebe-HER-2-Untersuchung

2.5.1 Testprinzip

Der DAKO Hercept-Test® ist ein immunhistochemisches Verfahren zur Routineuntersuchung der HER-2-Expression in Gewebeproben und vollzieht sich in zwei Schritten.

Zielstruktur des Tests ist der menschliche HER-2-Rezeptor in der Zellwand.

In einem ersten Schritt bindet ein gegen menschliches HER-2-Protein gerichteter Kaninchen-Antikörper (primärer Antikörper) an die Zielstruktur im Gewebe. In einem zweiten Schritt erfolgt die Zugabe einer bereits gebrauchsfertigen Visualization Reagenz. Diese besteht aus einem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper Molekül (sekundärer Antikörper) und einem Meerrettich-Peroxidase Molekül mit gemeinsamer Dextran-Polymer-Bindung. Nach Zugabe des DAB Chromogen erfolgt die peroxidasebedingte Umwandlung zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt.

Anschließend ist eine lichtmikroskopische Auswertung der angefärbten Gewebeschnitte möglich.

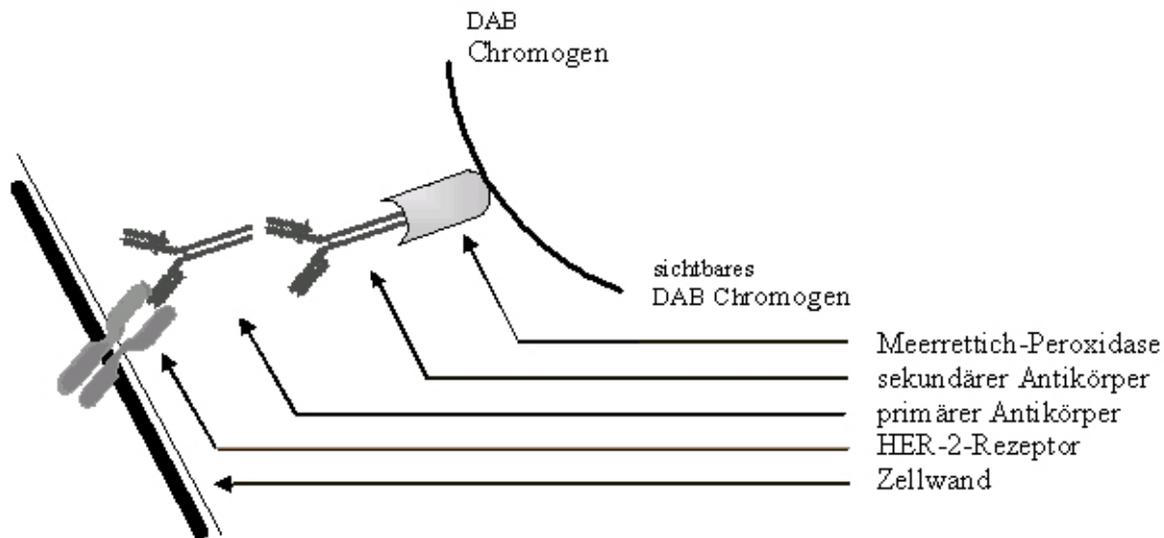


Abbildung 3: Schema des DAKO Hercept-Test®

2.5.2 Substanzen

Xylol

Ethanol 95% und 70%

Peroxidase-Blocking Reagent

Wasch-Puffer (1:10)

Rabbit Anti-Human HER-2 Protein (monoklonaler Antikörper)

Visulization Reagent (Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Dextran-Polymer)

Negative Control Reagent

Substrate-Chromogen Solution (1 ml DAB Puffer-Substanz + 25-30 µl DAB Chromogen)

saures Hämalaun (nach Mayer)

Aqua dest.

Die Gewebe wurden nach der Tumorresektion in Paraffin eingebettet und standen somit ausschließlich als Paraffinblöcke zur Verfügung.

2.5.3 Durchführung

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Tumorverzeichnisses und vorgefertigten HE-Schnitten dem Archiv des Pathologischen Institutes entnommen. Blöcke aus auswärtigen Instituten wurden an das Pathologische Institut der Universität Halle übersandt. Die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte

unter Verwendung des Hercept-Test® gemäß Anwendungsprotokoll der Firma DAKO.

1. Die Gewebe wurden mittels eines Mikrotom auf eine Dicke von 2-4 μm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Im Anschluss daran wurden sie für mindestens 2 Stunden bei 58°C getrocknet
2. Danach erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte in einem Xylol-Bad für zweimal 10 Minuten und eine anschließende Hydratation in einer absteigenden Ethanolreihe bis Aqua dest.
3. Danach wurden die Schnitte für 40 Minuten bei 96°C in einem Wasserbad mit Epitope Retrieval Solution inkubiert. Nach zwanzigminütigem Abkühlen auf Raumtemperatur (im TBS Puffer) wurde nochmals mit TBS Puffer nachgespült.
4. Durch fünfminütige Inkubation mit dem Peroxidase-Blocking Reagent wurde die endogene Peroxidase blockiert. Danach erfolgte eine Spülung mit TBS Puffer für fünf Minuten.
5. Jetzt erfolgte die Zugabe von ca. 100 μl Rabbit Anti-Human HER-2 Protein, einem gegen das C-terminale Fragment des HER-2 Moleküls gerichteter monoklonaler Antikörper. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es wurde im Anschluss für fünf Minuten mit TBS Puffer gespült.
6. Danach wurde ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper (Visulization Reagent) hinzugegeben, welcher sich in einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an den bereits gebundenen primären Antikörper (Rabbit Anti-Human HER-2 Protein) anheftete. Anschließend wurde wie oben mit TBS Puffer gespült.
7. Jetzt wurde für 10 Minuten 100 μl Substrate-Chromogen Solution mit DAB (frisch gemischt) hinzugegeben, was zu einem braunen Farbumschwung führte.
8. Nach Spülung mit Leitungswasser und Aqua dest. wurde das Procedere mit einer ca. einminütigen Zugabe von saurem Hämalaun (zur Kernfärbung) und anschließendem Bläuen im Leitungswasser (für 10 Minuten) beendet.
9. Eine Eindeckung der Schnitte erfolgte mit Enkitt.
10. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Entsprechend einer evaluierten Auswertungstabelle

der Firma DAKO wurden die Gewebe in HER-2 positiv und –negativ (Skala 0-3+) eingeteilt:

Färbung	Score	HER-2 Überexpression
keine Zellmembranfärbung; oder Färbung in weniger als 10% der Tumorzellen	0	negativ
schwache und unvoll- ständige Membranfärbung in mehr als 10% der Tumor- zellen	1+	negativ
schwache bis mäßige komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumor- zellen	2+	schwach positiv
starke komplette Membran- färbung in mehr als 10% der Tumorzellen	3	stark positiv

Tabelle 3: Auswertungstabelle der Firma Dako (Hercept-Test®)

Als HER-2 positiv gelten alle Patienten mit einer Gewebe-HER-2 Expression von 3+ (Dako-Score: 0 – 3+). Alle Gewebe mit einem Score von 2+ sollten nach internationalen Empfehlungen auf DNA-Ebene mittels FISH bzw. CISH überprüft werden. Alle IHC 2+ Gewebe, welche in der CISH/FISH eine Gen-Amplifikation zeigen, werden ebenfalls als HER-2 positiv gewertet und stehen den entsprechenden Therapieoptionen zur Verfügung.

2.6 CISH (Chromogene In-situ-Hybridisierung)

2.6.1 Testprinzip

Die In-situ Hybridisierung (ISH) arbeitet auf der Grundlage des direkten Nachweises von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in Zellen oder Zellverbänden. Digoxigenin-markierte Nukleinsäuresonden binden hierbei an ihren komplementären Basenstrang in der Probe (Hybridisierung). Nach der In-situ Hybridisierung erfolgt eine Inkubation mit nicht immunisiertem Serum, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Anschließend wird mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper (gegen Digoxigenin) inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit einem gegen den FITC-Rest des Sekundärantikörper gerichteten Tertiärantikörper (HRP-konjugierter FITC Antikörper). Durch das Hinzugeben einer Substrat /Chromogenlösung wird durch eine enzymatische Spaltungsreaktion der Peroxidase-markierte Tertiärantikörper sichtbar gemacht.

In dieser Arbeit werden alle 2+ (IHC) befundeten Proben, wie von internationalen Referenzzentren empfohlen, durch eine ISH überprüft. Es wurde eine CISH verwendet, da die Vorteile gegenüber einer FISH (Fluoreszenz In-situ Hybridisierung) auf der Hand liegen: Mit der CISH können gesamte Zellverbände dargestellt werden. Außerdem ist eine lichtmikroskopische Auswertung möglich (vs. Fluoreszenzmikroskop bei FISH). Hinzu kommt der Vorteil einer langen Lagerungsdauer ohne Verlust der Beurteilbarkeit. Die CISH ist, wie die FISH, eine bei der FDA registrierte Methode zur Messung der HER-2 Amplifikation in Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe.

2.6.2 Substanzen

Ethanol (Alkoholreihe: 70%, 85%, 95%, 100%)

Aqua dest.

SSC Puffer (auf 0,5% verdünnt)

PBS- und PBS-Tween 20 (0,025%ig im PBS-Puffer) Puffer

3%iges H₂O₂

Hämalaun

aus KIT:

Spot-light Tissue-Pretreatment Puffer

Spot-light Pretreatment Enzym

Digoxigenin-markierte c-erbB-2 Sonde (Primärantikörper)

FITC-Schaf-Anti-Digoxigenin Antikörper (Sekundärantikörper)
HRP-Ziege-anti- FITC Antikörper (Tertiärantikörper)
DAB-Chromogen

2.6.3 Durchführung

Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht.

Durchführung der Denaturierung und Hybridisierung (1.Tag)

1. Die Gewebe wurden mittels eines Mikrotom auf eine Dicke von 2-4 μm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Im Anschluss daran wurden sie für mindestens 2 Stunden bei 58°C getrocknet
2. Danach erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte in einem Xylol-Bad für zweimal 10 Minuten und für dreimal 3 Minuten in 100% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte bei 37°C getrocknet.
3. Die Schnitte wurden mit Spot-light Tissue-Pretreatment Puffer bei 92°C für 12 Minuten vorbehandelt. Nach dreimaligem (je 2 Minuten) Spülen mit PBS-Puffer bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Vorbehandlung mit Spot-light Pretreatment Enzym bei 37°C für 4 Minuten. Anschließend wurde dreimal 2 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen.
4. Die Schnitte wurde mit einer aufsteigenden Ethanolreihe: 70%->85%->95%->100% (je 2 Minuten) entwässert und anschließend luftgetrocknet.
5. Nachdem ca. 15 μl c-erbB-2 Sonde auf die Schnitte aufgetragen wurden, erfolgte ein luftdichter Verschluss durch Aufbringen der Deckgläser.
6. Die Objektträger wurden nun bei 94°C für 4 Minuten auf einer Heizplatte denaturiert und anschließend bei 37°C im Dunkeln in einer feuchten Kammer für 16-24 Stunden gelagert.

Durchführung nach der Hybridisierung (2.Tag)

1. Zunächst wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt. Danach erfolgte ein Waschschriff mit 0,5%igem SSC Puffer bei 75°C für zweimal 5 Minuten.
2. Objektträger wurden in PBS-Tween 20 Puffer bei Raumtemperatur für dreimal 2 Minuten gewaschen.
3. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 3%iger H_2O_2 (in Aqua dest) behandelt

- und anschließend mit PBS-Tween 20 Puffer für dreimal 2 Minuten gewaschen.
4. Es wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Reagenz A (10 %iges nicht immunisiertes Ziegenserum) inkubiert (Serumblockierung), danach abdekantiert.
 5. Danach erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem gebrauchsfertigen FITC-Schaf-Anti-Digoxigenin Antikörper (Sekundärantikörper) mit anschließendem Waschgang mit PBS-Tween 20 Puffer für dreimal 2 Minuten.
 6. Im nächsten Schritt wurde mit dem Tertiärantikörper (HRP-Ziege-anti-FITC Antikörper) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals mit PBS-Tween 20 Puffer für dreimal 2 Minuten gewaschen.
 7. Um den Tertiärantikörper sichtbar zu machen, erfolgte die Zugabe von DAB-Chromogen für ca. 20 Minuten.
 8. Nach einem Waschgang mit Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung (2ml auf 50 ml Aqua dest.) für maximal 10 Sekunden.
 9. Die Eindeckung der Schnitte erfolgte mit Enkitt.

Die Auswertung wurde mittels eines herkömmlichen Lichtmikroskops vorgenommen. In „normalen“ (nicht überexprimierten) Zellen sind maximal (je nach Anschnitt der Zellen) 2 Anfärbungen intrazellulär zu erkennen. Die Zellverbände mit einer Genamplifikation zeigen deutlich vermehrte Gen-Kopiezahlen (mehrere Anfärbungen).

2.7 Auswertung und Statistik

Die gesamte Arbeit wurde mit Microsoft Word® geschrieben. Die Datenerfassung erfolgte mittels Microsoft Excel®. Die Statistische Auswertung der Daten wurde mit StatView 4.51 Fa. Abacus und Excel (Abbildung 5) durchgeführt.

Zur Darstellung der Überlebenszeiten in Abhängigkeit von Metastasierung, HER-2 Serumkonzentration, CEA und LDH wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt (Abbildung 6-10). Zum statistischen Vergleich von Serum HER-2 Konzentration versus Metastasenstatus bzw. Gewebeexpression wurde der Fisher's Exact Test herangezogen (Tabelle 5 und 7). Die übrigen Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern und der Serum HER-2 Konzentration bzw. Gewebeexpression wurden mittels Chi-Quadrat-Tests berechnet und in zwei Tabellen zusammengefasst (Tabelle 4 und 6).

3. ERGEBNISSE

3.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe standen 20 Serumproben von 20 gesunden Personen zur Verfügung. Die Altersspanne betrug 19 – 60 Jahre (Mittelwert: 33,5). Das Verhältnis männlich zu weiblich war 1:1.

Von allen 20 Proben wurde die Serum-HER-2 Konzentration mit folgendem Ergebnis ermittelt:

Mittelwert	2184 U/ml
Median	2160 U/ml
Standardabweichung	705 U/ml

Die Streubreite reichte von 1127 U/ml bis 4218 U/ml.

Es ließ sich keine Korrelation innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den Serum-HER-2 Werten und den erhobenen Laborwerten (Kreatinin, Bilirubin gesamt, LDH, AP, Hb, CRP, Thrombozyten, Leukozyten) bzw. dem Alter herstellen.

Innerhalb der Kontrollgruppe wiesen 90% der Serum HER-2 Konzentrationen einen Wert unter 3000 U/ml auf. Zusammen mit der Empfehlung der Firma Oncogene Research Products (Hersteller des verwendeten ELISA-Kits) definierten wir 3000 U/ml als Grenzwert für die weiteren Auswertungen.

3.2 Patientenkollektiv

3.2.1 HER-2 Serumkonzentrationen

Im Serum von 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen wurden die HER-2 Serumkonzentrationen mittels eines ELISA mit folgenden Ergebnissen ermittelt:

Mittelwert	2566 U/ml
Median	2511 U/ml

Die Streubreite reichte von 1376 U/ml bis >6000 U/ml.

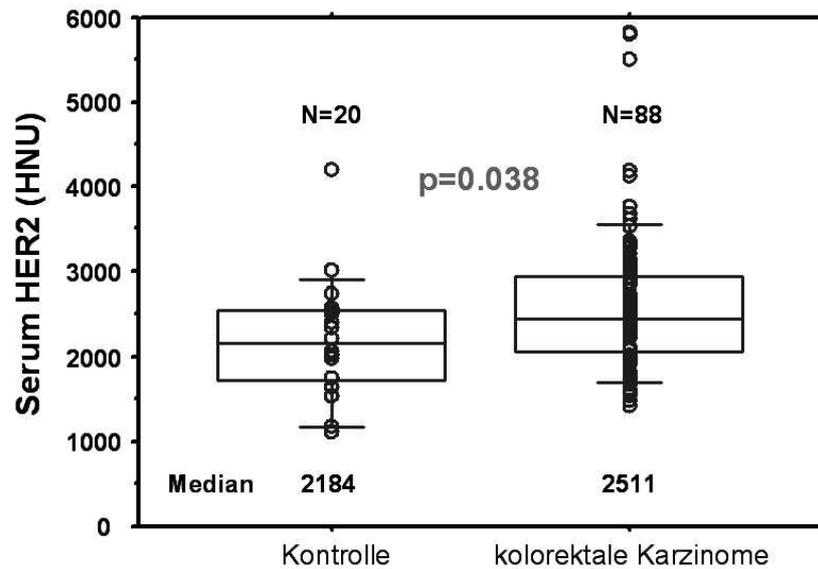


Abbildung 4: Boxplot: Kontrollgruppe vs. Patientenkollektiv (88 kolorektale Karzinome) in Abhängigkeit vom HER-2 Serumlevel

Im Patientenkollektiv lagen die HER-2 Serumkonzentrationen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Median 2511 vs. 2184 HNU; $p=0,038$).

HER2 Serumkonzentrationen

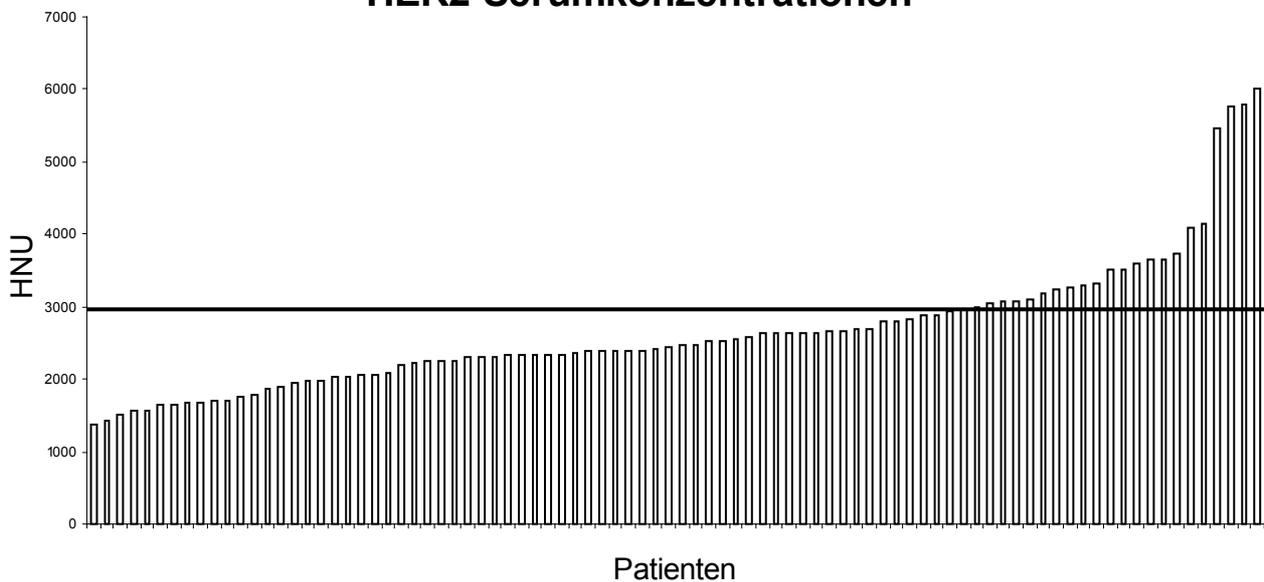


Abbildung 5.: HER-2 Serumkonzentrationen aller 88 kolorektalen Karzinome

21 von 88 Patienten zeigten eine erhöhte HER-2 Serumkonzentration (>3000 U/ml)

3.2.1.1 Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Serumkonzentration (Übersicht)

Alle erhobenen Parameter wurden mit den gemessenen HER-2 Serumkonzentrationen (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU) korreliert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Übersichtstabelle (Tabelle 3) dargestellt.

signifikante Korrelation		keine Korrelation	
p-value	Parameter	p-value	Parameter
0.0046	laufende Chemotherapie	0.97	Alter
0.0088	Lebermetastasen	0.81	vorhandene Fernmetastasen
0.0159	CEA	0.43	Gewebeexpression (IHC Dako score)
0.0198	Bilirubin		
0.0050	Alkalische Phosphatase	0.16	LDH
		0.12	CRP
		0.26	Kreatinin
		0.34	Leukozytenzahl
		0.92	Haemoglobin
		0.096	CA 19-9

Tabelle 4: Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Serumkonzentration

Die HER-2 Serumkonzentrationen korrelierten signifikant mit CEA (p=0,0159), Bilirubin (p=0,0198), Alkalische Phosphatase (p=0,0050) und laufender Chemotherapie (p=0,0046). Bei den Parametern Alter, Fernmetastasierung, LDH, CRP, Kreatinin, Leukozytenzahl, Hämoglobin und CA 19-9 konnte keine Beziehung zu den HER-2 Serumleveln nachgewiesen werden.

3.2.1.2 Korrelation Metastasenstatus vs. HER-2 Serumkonzentration

Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen geteilt: mit Fernmetastasen (M+) vs. ohne Fernmetastasierung (M-) und mit den HER-2 Serumkonzentrationen (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU) korreliert.

21 Patienten hatten sowohl Fernmetastasen als auch ein erhöhtes HER-2 Serumlevel (≥3000 HNU). Hingegen zeigten die 59 anderen Patienten mit metastasierten Karzinomen keine Erhöhung der HER-2 Serumkonzentration.

Es konnte keine statistische Signifikanz hergestellt ($p=0,19$) werden. Jedoch hatte keiner der 8 Patienten ohne Fernmetastasen eine HER-2 Serumkonzentration größer als 3000 HNU.

	<3000 HNU	≥3000 HNU	Gesamt
M+	59	21	80
M-	8	0	8
Gesamt	67	21	88

$p=0.19$

Tabelle 5: Fisher`s Exact Test: Metastasenstatus (M+ vs. M-) gegen HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)

Weiterhin fiel auf, dass Patienten mit Lebermetastasen eine signifikant höhere HER-2 Serumkonzentration als Patienten ohne Lebermetastasen zeigten.

3.2.1.3 Überlebenszeiten vs. HER-2 Serumkonzentration (Kaplan-Meier)

Im Kaplan-Meier Test konnte sehr eindrucksvoll die Abhängigkeit der HER-2 Serumkonzentration vom Gesamtüberleben der Patienten dargestellt werden. Um den Einfluss der Fernmetastasierung zu zeigen, wurde der Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und HER-2 Serumkonzentrationen in zwei verschiedenen Patientenzusammensetzungen betrachtet: zum einen alle kolorektalen Karzinome (M+ und M-) und zum anderen nur fernmetastasierte kolorektale Karzinome. Patienten mit normalen HER-2 Serumkonzentrationen hatten in beiden Gruppen eine signifikant längere Überlebenszeit ($p=0.0006$ bzw. 0.0042).

Hier stellte sich das mediane Überleben wie folgt dar:

- HER-2 Serumlevel <3000 HNU = medianes Überleben von 17,4 Monaten
- HER-2 Serumlevel ≥3000 HNU = medianes Überleben von nur 8 Monaten.

Die Unterschiede beider Gruppen werden aus den folgenden beiden Kaplan-Meier Kurven (Abbildung 6 und 7) ersichtlich:

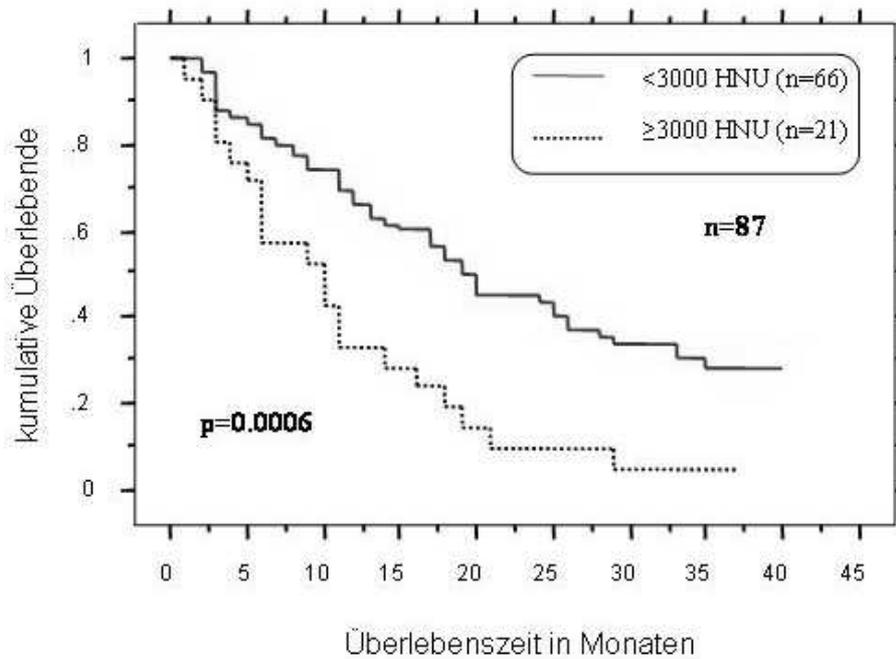


Abbildung 6: Kaplan-Meier Test: 87 kolorektale Karzinome mit und ohne Fernmetastasen (M+ und M-) in Abhängigkeit von der HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)

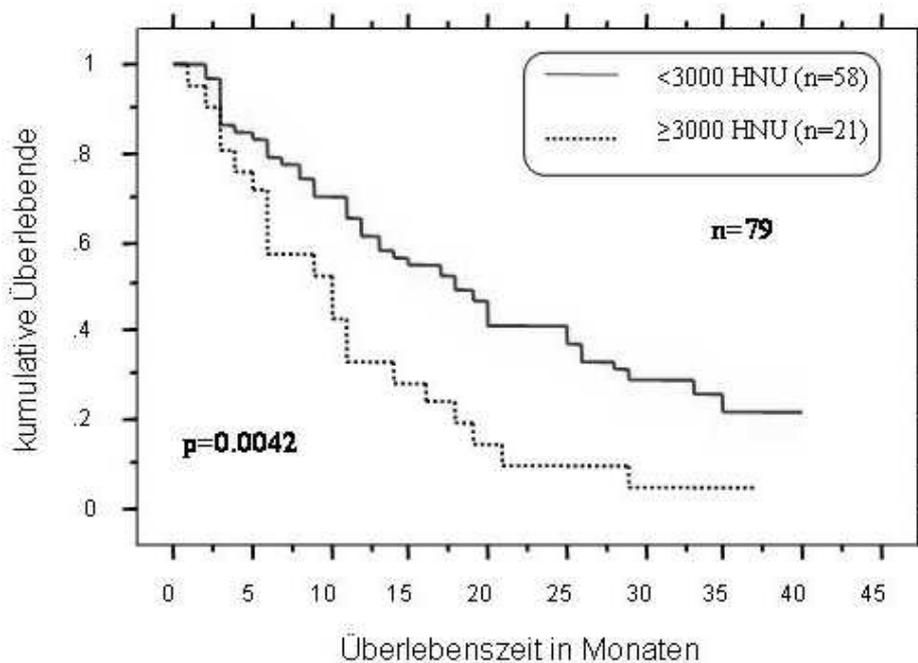


Abbildung 7: Kaplan-Meier Test: 79 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit von der HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU)

3.2.2 Überlebenszeiten in Abhängigkeit von anderen Parametern

Eine Korrelation der HER-2 Serumkonzentrationen mit CEA bzw. LDH erbrachten ebenfalls überraschende Ergebnisse. Es wurde im Kaplan-Meier Test 68 kolorektale Karzinome mit und ohne Fernmetastasen bzw. 62 Patienten nur mit Fernmetastasen mit den entsprechenden CEA-Werten (<50 ng/ml vs. ≥50 ng/ml) in Beziehung gebracht (Abbildung 8 und 9). Von den übrigen Patienten waren keine CEA-Werte verfügbar gewesen. Hierbei ergab sich ein signifikanter Überlebensvorteil ($p=0.0001$) für Patienten mit CEA-Werten <50 ng/ml. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen LDH (<10 $\mu\text{mol/lxs}$ vs. $\geq 10 \mu\text{mol/lxs}$) und Überleben der Patienten mittels Kaplan-Meier Test untersucht (Abbildung 10). Es ergab sich eine signifikante Korrelation von $p=0.0002$. Sowohl CEA ($p=0.0001$) wie auch LDH ($p=0.0002$) korrelierten signifikanter mit der Überlebenszeit der Patienten als das Serum-HER-2 ($p=0.0006$ bzw. $p=0.0042$)

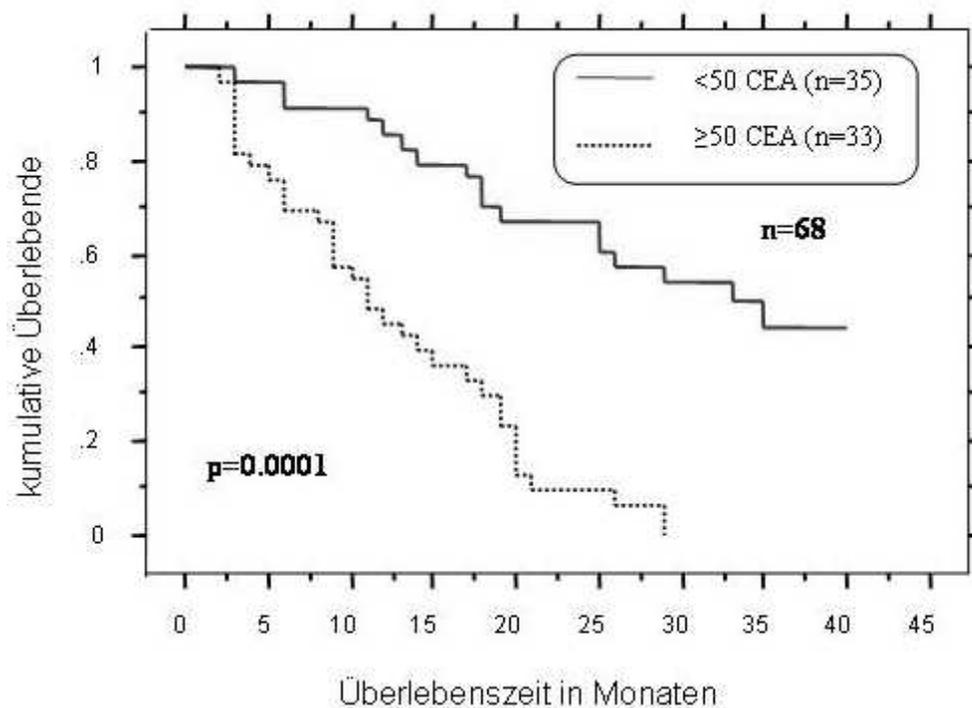


Abbildung 8: Kaplan-Meier Test: 68 kolorektale Karzinome mit und ohne Fernmetastasen (M+ und M-) in Abhängigkeit vom CEA (<50 ng/ml vs. ≥50 ng/ml)

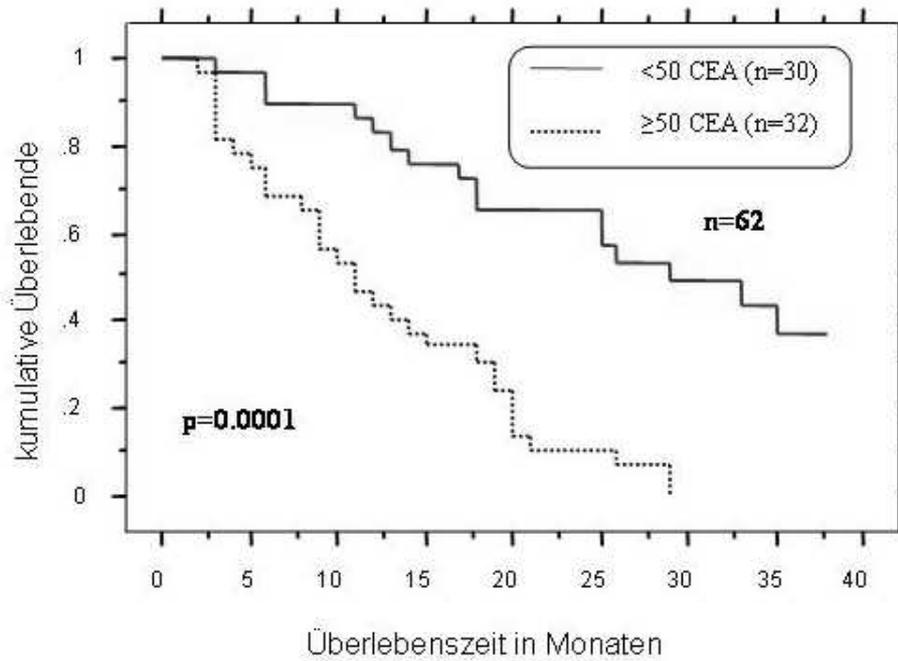


Abbildung 9: Kaplan-Meier Test: 62 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit vom CEA (<50 ng/ml vs. ≥50 ng/ml)

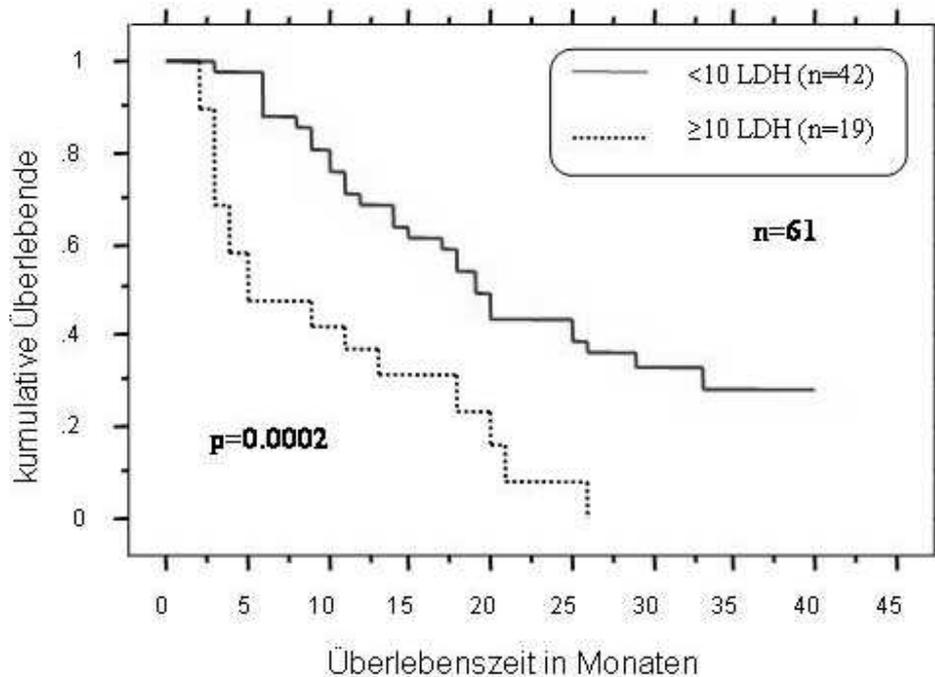


Abbildung 10: Kaplan-Meier Test: 61 kolorektale Karzinome nur mit Fernmetastasen (M+) in Abhängigkeit von LDH (<10 μmol/l vs. ≥10 μmol/l)

3.2.3 HER-2 Gewebeexpressionen

Bei 74 der 88 in die Studie eingeschlossenen Patienten stand Gewebematerial zur Verfügung. Alle 74 Gewebe wurden mittels IHC (Dako Hercept-Test®) auf Gewebeexpression von HER-2 untersucht. Die Auswertung wurde lichtmikroskopisch in unabhängiger Doppelbestimmung durchgeführt. Alle folgenden Bilder wurden im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen und gehören zum Patientenkollektiv (außer Abbildung 14: Magen-Karzinom mit 3+ Dako score zum Vergleich)

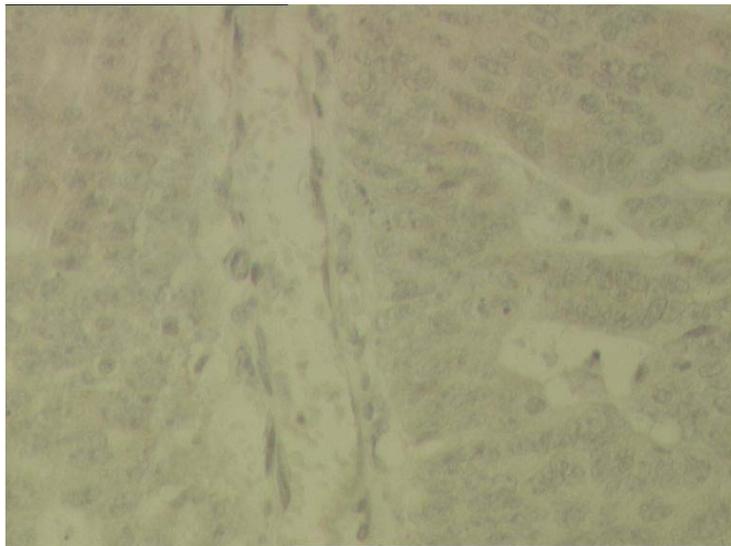


Abbildung 11: Dako score 0 (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung

In Abbildung 11 konnten nur vereinzelt Zellmembranen unvollständig angefärbt werden. Die Gesamtanfärbung der Zellmembran lag hierbei deutlich unter 1%. Somit war diese Gewebeprobe mit dem Dako score 0 zu befunden.

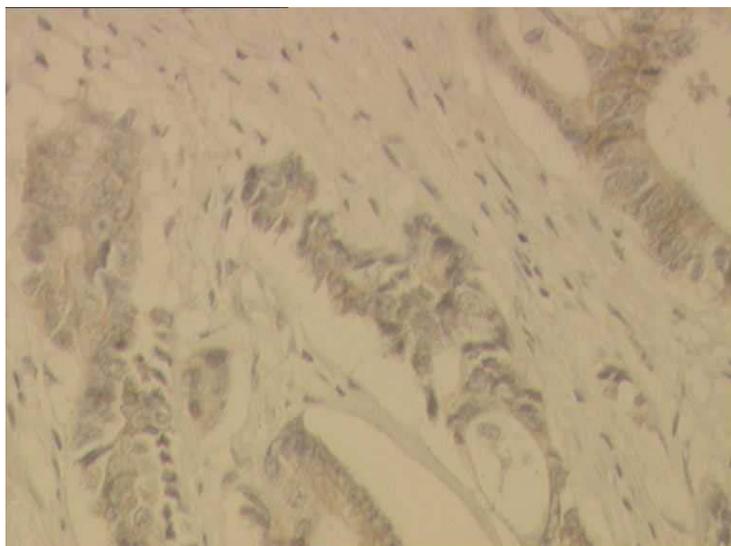


Abbildung 12: Dako score 1+ (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung

In Abbildung 12 hingegen sind schwache unvollständige Zellmembrananfärbungen in einer Gesamtzellmasse von über 10% zu erkennen. Der Befund wurde nach den standardisierten Hercept-Test® Auswertungsrichtlinien als 1+ gewertet.

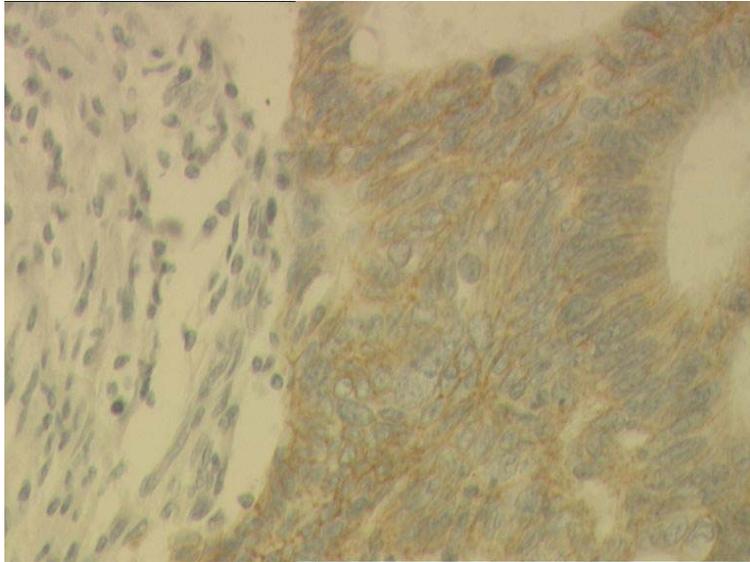


Abbildung 13: Dako score 2+ (kolorektales Karzinom) in 200facher Vergrößerung

Abbildung 13 zeigt mäßige komplette Membranfärbungen in mehr als 10% Tumorgewebe und wurde somit als typischer 2+ Befund gewertet.

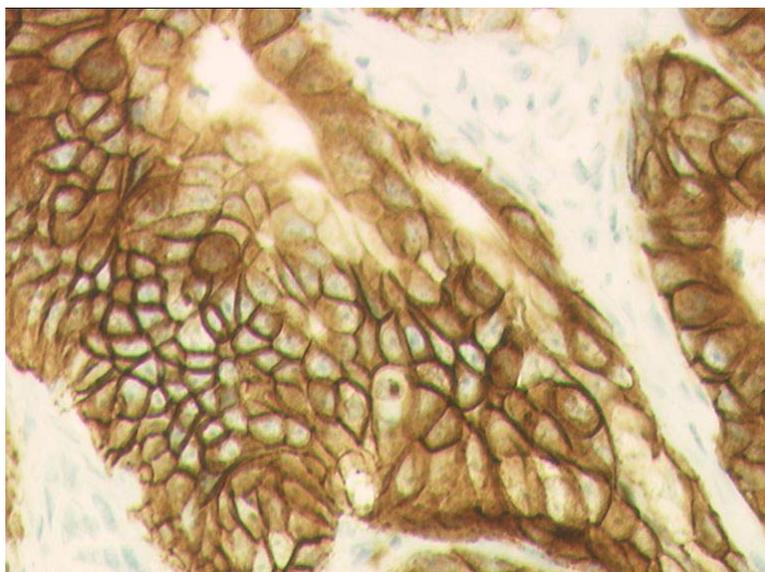


Abbildung 14: Dako score 3+ (Magen-Karzinom) in 200facher Vergrößerung

Abbildung 14 ist ein Vergleichsschnitt aus einem Magenkarzinom, welches im gleichen Arbeitsgang wie die in dieser Arbeit verwendeten kolorektalen

Gewebeschnitte angefertigt und ausgewertet wurde. Es ist eine eindrucksvolle starke, die komplette Membran umfassende, Färbung in weit über 10% der gesamten Tumorzellen zu erkennen. So sieht ein eindeutiger 3+ Dako score Befund aus.

Lediglich 16 der 74 Gewebe (21,6%) zeigten eine schwache HER-2 Expression (9 x 1+, 7 x 2+, Dako score). Keines der untersuchten kolorektalen Gewebe zeigte eine starke Überexpression von 3+.

3.2.3.1 Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Gewebeexpression (Übersicht)

Alle HER-2 Gewebewerte wurden mit den entsprechend erhobenen Parametern korreliert (Dako score 0 vs. 1/2) und in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

signifikante Korrelation		keine Korrelation	
p-value	Parameter	p-value	Parameter
0.0470	Lebermetastasen	0.73	Alter
0.0389	Alkalische Phosphatase	0.38	Fernmetastasen
		0.20	laufende Chemotherapie
		0.16	HER-2 Serumkonzentration
		0.85	CA 19-9
		0.52	CRP
		0.77	Bilirubin
		0.0539	LDH

Tabelle 6: Korrelation Labor-/Tumorparameter vs. HER-2 Gewebeexpression

Die HER-2 Gewebeexpressionen korrelierten signifikant mit Alkalische Phosphatase (p=0.0389) und mit der Anwesenheit von Lebermetastasen (p=0.0470) Es konnte jedoch keine Beziehung zwischen den Parametern Alter, Fernmetastasierung, laufende Chemotherapie, LDH, Bilirubin, CRP und CA 19-9 zu den jeweiligen HER-2 Gewebeexpressionen nachgewiesen werden.

3.2.3.2 CISH-Ergebnisse

Im Rahmen der Arbeit wurden alle 2+ Hercept® Befunde einer Chromogen In-situ Hybridisierung (CISH) zugeführt, um eine Überexpression eindeutig auf DNA-Ebene (Genamplifikation) nachzuweisen. Jedoch nur bei 2 von 6 getesteten 2+ Dako score konnte eine HER-2 Genamplifikation nachgewiesen werden (Abbildung 16 und 17)

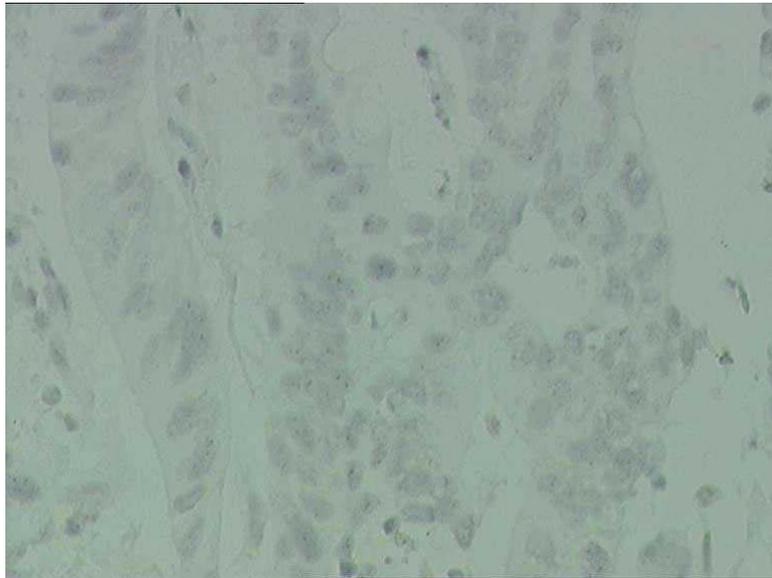


Abbildung 15: CISH negativ – 200 fache Vergrößerung

In Abbildung 15 zeigten sich pro Zelle nicht mehr als zwei c-erbB-2 Genkopien (als chromogene punktförmige Zellinhalte angefärbt). Somit lag keine HER-2 Genamplifikation vor.

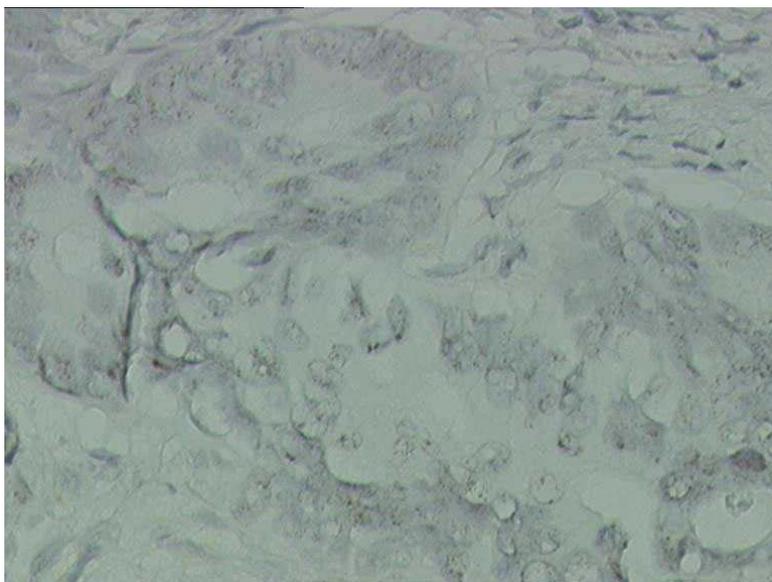


Abbildung 16: CISH positiv – 200 fache Vergrößerung

In Abbildung 16 hingegen sieht man deutlich, dass in einigen Zellen mehr als zwei angefärbte Genabschnitte vorhanden sind. Besonders eindrucksvoll kann man dies in der 400 fachen Vergrößerung (Abbildung 17) erkennen. Aufgrund der Schnittführung durch das Gewebe zeigen die Zellen nicht immer die tatsächliche Anzahl der Genkopien an.

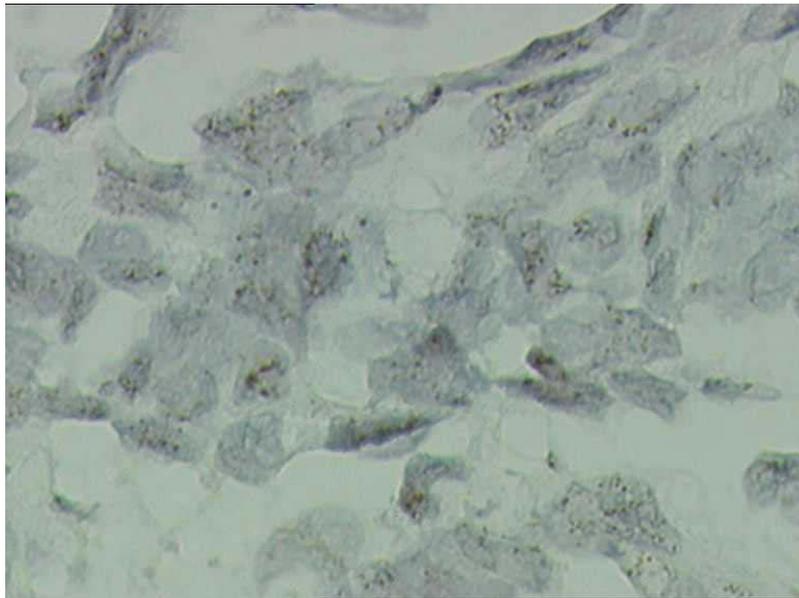


Abbildung 17: CISH positiv – 400 fache Vergrößerung

3.2.3.3 Korrelation HER-2 Serumkonzentrationen vs. HER-2 Gewebeexpressionen

Um die Beziehung zwischen HER-2 Gewebeexpressionen und HER-2 Serumkonzentrationen darzustellen, wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit einer HER-2 Serumkonzentration <3000 HNU und mit einer Konzentration ≥ 3000 HNU. Diese Grenze wurde anhand der Empfehlung der Firma Dianova (Hersteller der in der Studie verwendeten ELISA – Kits) übernommen. In der Auswertung der ELISA-Werte wird diese standardisierte Grenze genutzt, um Serum-positive Ergebnisse von Serum-negativen Ergebnissen abzugrenzen. Eine Korrelation wurde im Fisher`s Exact Test gegen Dako score 0 bzw. Dako score 1/2 durchgeführt (Tabelle 6). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen den HER-2 Gewebeexpressionen und den entsprechenden HER-2 Serumkonzentrationen gefunden werden ($p=0.33$).

	Dako score 1 / 2	Dako score 0	Gesamt
<3000 HNU	10	45	55
≥3000 HNU	6	13	19
Gesamt	16	58	74
			p=0.33

Tabelle 7: Fisher`s Exact Test: HER-2 Serumkonzentration (<3000 HNU vs. ≥3000 HNU) gegen Gewebeexpression (Dako score 0 vs. Dako score 1/2)

4. DISKUSSION

4.1. Einordnung der Ergebnisse in den derzeitigen Wissensstand zum HER-2/neu

Eine Amplifikation und Überexpression des HER-2/neu wurde in zahlreichen Untersuchungen bei Karzinomen verschiedenen Ursprungs gefunden (11, 30, 35, 49, 73, 81, 83, 85-90, 103-127). Hierin zeigt sich die potenziell große Bedeutung von HER-2/neu als Onkogen. Trotzdem sind bis heute die Vorstellungen davon, welche genaue Rolle c-erbB-2 in der Karzinogenese spielt, noch sehr vage. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass das Protoonkogen c-erbB-2 vor allem bei der Entwicklung des Mammakarzinoms einen wichtigen Einfluss hat (47, 50, 52-54, 56, 87, 135). Der Zusammenhang zwischen Überexpression bzw. HER-2 Genamplifikation und schlechter Prognose bzw. Aggressivität des Tumors wurde in zahlreichen Studien bewiesen (47, 49, 72-88, 136). So war und ist es möglich, den HER-2-Status zusammen mit anderen Parametern als Prognosefaktor einzusetzen. Heute ist der HER-2 Status beim Mammakarzinom neben dem Nodalstatus und der Hormonrezeptorexpression der wichtigste prognostische Faktor (85-87). Weiterhin deutet eine Vielzahl von Studien auf eine Nutzbarkeit des „Shed-Antigens“ (p185) zur Verlaufskontrolle beim Mammakarzinom hin (63, 67-71). Schließlich machte man sich den HER-2 Rezeptor als spezifisches Target für eine monoklonale Antikörper-Therapie des Mammakarzinoms zu Nutzen (57, 87, 88, 96, 97). Der in diesem Zusammenhang angewandte humanisierte rekombinante monoklonale

Antikörper Trastuzumab (HERCEPTIN®) wurde bereits 1998 in den USA als First-line-Therapie in Kombination mit Paclitaxel und als Second-line/Third-line-Therapie als Monotherapie beim metastasierten HER-2-positiven Mammakarzinom zugelassen (137).

Beim kolorektalen Karzinom existieren bisher nur wenige Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung des HER-2. Einige Studien zeigten jedoch eine Überexpression in 10-15% aller kolorektalen Tumore und eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose (114-117, 136). Eine neuere Studie konnte auch eine Korrelation des verwandten HER-1 Rezeptor (EGFR) mit einer schlechteren Prognose beim Kolonkarzinom zeigen (138).

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit einzelne Erkenntnisse aus den Forschungen am Mammakarzinom auf das kolorektale Karzinom übertragbar sind. Hierzu wurden die Serum-HER-2 Konzentrationen von 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen gemessen. Außerdem wurde bei 74 dieser Patienten die HER-2 Überexpression im Gewebe des Primärtumors überprüft (mittels IHC + CISH).

4.2. Serum-HER-2 Konzentrationen

Am untersuchten Patientenkollektiv von 88 kolorektalen Karzinomen konnte ein signifikant höheres Serum-HER-2 Level als in der 20 Personen umfassenden Kontrollgruppe detektiert werden (Median 2511 vs. 2184 U/ml; $p=0.038$). Hierdurch ergibt sich der unmittelbare Zusammenhang des HER-2 mit der Tumorerkrankung. Weiterhin zeigte eine Korrelation zwischen Überlebensstatus und Serum-HER-2 Level einen eindrucksvollen Überlebensvorteil für Patienten mit niedrigem oder normalem Serum-HER-2 Level. Patienten mit HER-2 Serumkonzentrationen <3000 HNU wiesen ein medianes Überleben von 17,4 Monaten auf. Bei Patienten deren Serumkonzentrationen ≥ 3000 HNU waren ergab sich eine Reduktion der medianen Überlebenszeit um 8,6 Monate. Das mediane Überleben lag hier bei nur 8 Monaten. Somit könnte die Bestimmung der Serumkonzentration des „Shed-Antigens“ eine Prognoseabschätzung erlauben.

Jedoch ist die pathophysiologische Rolle des löslichen HER-2 Fragments noch weitgehend unklar (62, 66). In unserer Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen Gewebe-HER-2 Expression und HER-2 Serumkonzentration hergestellt werden. Ebenso korrelierte auch der Metastasierungsstatus (M+ vs. M-) nicht mit dem Serum-HER-2 Level. Fraglich bleibt daher die Herkunft der erhöhten HER-2 Serumkonzentrationen bei besonders aggressivem Krankheitsverlauf mit schlechter Prognose. Womöglich sind die erhöhten Serumwerte vielmehr auf eine Reaktion des

Körpers auf den Tumor, als auf eine Herkunft aus dem (HER-2 über-exprimierenden) Tumorgewebe selbst zurückzuführen.

Die Serum-HER-2 Konzentration im Blut wird außerdem durch verschiedene Parameter beeinflusst. So können unspezifische Zellzerfallvorgänge (Entzündungen, Therapieansprechen etc.) Einfluss auf die gemessene Serum-Konzentration haben, da hier Spaltprodukte des HER-2 Rezeptors, die noch eine intakte Ligandenbindungsstelle enthalten, freierwerden und sich im Messergebnis der ELISA niederschlagen.

Wichtiger als der absolute Serum-HER-2 Wert ist daher der Verlauf der Serum-HER-2 Konzentration zu werten, da zu viele Patienten-spezifische Parameter Einfluss auf die absolute Serum-HER-2 Konzentration nehmen. Hier sei auf Erkenntnisse bei der Verlaufskontrolle von Mammakarzinomen verwiesen: Anstieg der Shed-Antigen Konzentration als Marker für Rezidiv/Progression (70, 113, 130-133). In der vorliegenden Arbeit fanden sich Hinweise, dass dieser Sachverhalt durchaus auf kolorektale Karzinome übertragbar ist. Bei der Korrelation zwischen Serum-HER-2 Konzentrationen und Metastasenstatus fiel auf, dass keiner der Patienten ohne Fernmetastasen einen HER-2 Serumwert von >3000 HNU hatte. Im Gegensatz dazu konnte, wie in anderen Studien auch (72), eine signifikante Erhöhung der Serum HER-2 Konzentration bei Lebermetastasierung gezeigt werden. Dies unterstützt die Überlegung, den HER-2 Serumwert als Verlaufsparameter beim kolorektalen Karzinom einzusetzen. Interessant wäre allerdings zu wissen, ob bei Patienten, die später eine Metastasierung oder ein Rezidiv entwickeln, der HER-2 Serumwert signifikant ansteigt. Die starke Korrelation erhöhter Serumwerte mit einer schlechteren Prognose in Form von signifikant kürzerer Überlebenszeit könnte ein Hinweis darauf sein. Das muss jedoch in weiterführenden Untersuchungen abschließend geklärt werden.

Jedoch zeigte die Korrelation von CEA ($p=0.0001$) und LDH ($p=0.0002$) mit den Überlebenszeiten eine jeweils stärkere Korrelation als das bei den Serum-HER-2 Konzentrationen der Fall war ($p=0.0006$). Als alleiniger Prognosefaktor ist der Serum-HER-2 Wert somit dem bekannten Tumormarker CEA und dem LDH-Wert geringfügig unterlegen. In multivariaten Analysen muss geprüft werden, ob nicht eventuell die Kombination von CEA, LDH und HER-2 Serumwerten einen idealen Prognosefaktor darstellt, welcher die Aussagekraft der einzelnen Parameter übersteigt.

Fehlereinschätzung für ELISA

Als Meßmethode für alle 88 Serum-HER-2 Konzentrationen wurde ein standardisierter ELISA-Kit der Firma Oncogene Research verwendet. Alle methodenbedingten Fehlerquellen (Pipettierfehler, unterschiedliche Lagerungszeiten der Proben etc.) hatten durch das standardisierte Verfahren und die durchgeführte Doppelbestimmung der Proben nur sehr geringen Einfluss auf das Messergebnis und beeinflussen die Aussagekraft der Serum-HER-2 Werte nicht.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen und schnellen Handhabung, der routinemäßigen Durchführbarkeit und den quantitativen vergleichbaren Ergebnissen.

4.3. Gewebeexpressionen

Beim Mammakarzinom gehört der Gewebe-HER-2 Status zur Standard-Diagnostik. Nach weitgehenden Empfehlungen kommt hierbei der standardisierte HERCEPT-Test® der Firma DAKO zum Einsatz. Die Ergebnisse werden bei der Überlegung des weiteren Procedere für mögliche Therapieoptionen herangezogen. Eine erhöhte HER-2 Expression spricht für eine schlechte Prognose, bietet jedoch die Möglichkeit einer Anti-HER-2 gerichteten Antikörper-Therapie.

Bei 74 Patienten stand Gewebematerial für eine immunhistologische Untersuchung zur Verfügung. Alle 74 Gewebe-HER-2 Expressionen wurden mittels HERCEPT-Test® der Firma DAKO im IHC-Labor des Pathologischen Instituts der Martin-Luther Universität untersucht. Nur bei einer geringen Zahl der Gewebeproben wurde eine schwache oder mittlere HER-2 Expression gefunden (9x 1+, 7x 2+ Dako-Score). Eine starke HER-2 Expression (Dako-Score 3+) konnte in keinem der untersuchten kolorektalen Gewebe gefunden werden. Die sieben 2+ Fälle wurden mittels CISH abgeklärt. Hiervon waren lediglich 2 Fälle Gen-amplifiziert und somit sicher positiv.

Die Ergebnisse der Gewebeuntersuchungen zeigen deutlich den geringen Anteil der HER-2 überexprimierenden kolorektalen Karzinome. Aufgrund dieser Daten erscheint das kolorektale Karzinom nicht geeignet für eine anti-HER-2 gerichtete monoklonale Antikörpertherapie wie das Mammakarzinom (20-30% sind 3+ HER-2 positiv!). Einzelne Patienten mit kolorektalem (HER-2 positiven)-Karzinom könnten jedoch von einer solchen Therapie profitieren. Ergebnisse hierzu liegen bis dato noch nicht vor.

In der Literatur liegt der Anteil der HER-2 überexprimierenden kolorektalen Karzinome bei 10-15 % (114-117). Die vorliegende Studie jedoch zeigt eine

Überexpression von weniger als 3 %. Mögliche Ursachen sind hier die kleine Fallzahl, unterschiedliche Grenzwerte für die Bezeichnung „Überexpression“ und die Verwendung voneinander abweichender Antikörper/Detektionsskits.

Fehlereinschätzung für die IHC und CISH

Neben typischen möglichen Fehlerquellen wie Lagerungszeiten der Gewebe, Pipettierfehler etc. steht hier die Ergebnis-Beurteilung der angefärbten Gewebe mittels Lichtmikroskop im Vordergrund. Zwar gibt es eine standardisierte Anleitung zur Beurteilung der Ergebnisse, jedoch dürfte die Auswertung in nicht geringem Maße von der befundenden Person abhängen. Eine weitere Fehlerquelle könnte sich durch die Inhomogenität der Tumorgewebe ergeben. Dabei kann die zufällige Schnittrichtung durch das entsprechende Gewebematerial zu falsch-positiven wie auch falsch-negativen Ergebnissen führen. Zur Eingrenzung dieser Fehlerquellen erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung durch zwei Personen und es wurde stichprobenartig eine Doppelbestimmung der Gewebe durchgeführt.

4.4 Vergleich von Gewebe-HER-2 Expression und Serum-HER-2 Konzentration

21 der 88 untersuchten Seren zeigten ein erhöhtes Serum-HER-2 Level (>3000 U/ml). Jedoch fand sich lediglich bei 2 der 74 untersuchten Gewebe eine sichere HER-2 Überexpression. Es konnte keine positive Korrelation zwischen Gewebe-HER-2 Expression und Serum-HER-2 Konzentration gefunden werden ($p=0.430$). Die Gewebe-HER-2 Expression per se zeigte keine Korrelation zum Überlebenszeitraum der Patienten ($p=0.74$ log-rank) und dürfte daher ungeeignet für die Prognoseabschätzung sein, während die Serum-HER-2 Konzentrationen sehr eindrucksvoll mit der Überlebenszeit der Patienten korrelierte ($p=0.024$ log-rank). Die Gründe hierfür könnten in der zeitlichen Differenz zwischen Tumor-Resektion und Blutentnahme liegen (in einigen Fällen waren dies mehrere Jahre). Auch die Haltbarkeit des HER-2 Rezeptors in gelagerten Gewebeproben ist noch weitgehend unklar. Möglicherweise ist eine Bestimmung an älteren Geweben nur noch unzureichend möglich und führte zu falsch-negativen Ergebnissen.

4.5. Korrelation mit anderen Parametern

Weder für die HER-2 Expression im Serum noch im Gewebe konnten Korrelationen zum Alter der Patienten, Lokalisation der Metastasen, LDH, CRP, Kreatinin, Leukozytenzahl, Hämoglobin aufgedeckt werden.

Als Indikator für eine schlechte Tumorbiologie und somit eine schlechtere Prognose gilt beim kolorektalen Karzinom u. a. das CEA im Serum und erhöhte alkalische Phosphatase (1). Mit beiden Parametern konnte eine positive signifikante Korrelation zu erhöhten Serum-HER-2 Konzentrationen hergestellt werden. Diese Korrelation mit bereits anerkannten Prognosefaktoren ist ein weiterer Hinweis auf die prognostische Aussagekraft des Serum-HER-2 Wertes beim kolorektalen Karzinom. Das CEA ist in der Verlaufskontrolle des kolorektalen Karzinoms von großer praktischer Bedeutung. Während nach kurativer Therapie der CEA-Spiegel in den Normbereich absinkt, spricht eine anhaltende Konzentrationserhöhung oder ein Wiederanstieg für einen Residualtumor und/oder für Metastasen (9). Außerdem stellt der erhöhte Tumormarker einen hervorragenden Verlaufsparemeter für das Ansprechen der Therapie dar (9). In der vorliegenden Studie wurde eine positive signifikante Korrelation des Serum-HER-2 Levels zum Chemotherapie-Status und zum CEA gezeigt. Die Nutzbarkeit des Serum-HER-2 Wertes zur Verlaufskontrolle für die Effektivität einer Therapie und Erkennung von Rezidiven/Metastasen scheint damit sehr wahrscheinlich zu sein. Weitere Untersuchungen sollten hier Klarheit bringen.

Jedoch korrelierten weder die Gewebe- noch die Serum-HER-2 Werte mit dem Tumormarker CA 19-9, welcher ebenfalls von Bedeutung in der Prognose und Verlaufskontrolle von kolorektalen Karzinomen ist (1, 9).

Weiterhin wurde eine positive Korrelation zwischen erhöhter Serum-HER-2 Konzentration und Auftreten von Lebermetastasen ($p=0.0088$) und Bilirubin-Wert ($p=0.0198$) gefunden. Obwohl die alleinige Lebermetastasierung für eine günstigere Prognose spricht (1), ist die Korrelation zum erhöhten Serum-HER-2 Level durch die Metastasierung an sich zu verstehen. Die Korrelation zum Bilirubin erklärt sich aus dem Zusammenhang mit der Lebermetastasierung und tumorbedingter Bilirubin-Stoffwechselstörungen.

Bei der Korrelation der Gewebe-HER-2 Expressionen zu den verschiedenen Parametern fand sich lediglich zur Lebermetastasierung ($p=0.0470$) und alkalischen Phosphatase ($p=0.0398$) eine positive signifikante Korrelation. Der Gewebe-HER-2 Wert scheint somit weder als Prognosefaktor noch für etwaige Verlaufskontrollen geeignet zu sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend ist festzustellen, dass zwar die große Bedeutung einer HER-2 Überexpression für Prognose und Therapie beim Mammakarzinom als bewiesen gelten kann, allerdings die bis dato vorliegenden Erkenntnisse im Bezug auf das kolorektale Karzinom noch eher vage sind.

In dieser Arbeit wurde bei 88 Patienten mit kolorektalen Karzinomen prospektiv die HER-2 Expression im Primärtumorgewebe und die Serum-HER-2 Konzentration analysiert. Eine Korrelation mit zum Teil retrospektiv erhobenen patienten- und tumorspezifischen Parametern sollte zur Klärung der tumorbiologischen Relevanz, insbesondere als mögliches Ziel einer anti-HER-2 gerichteten Therapie, beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Patientenkollektiv eine deutlich geringere HER-2 Serumkonzentration aufwies als eine gesunde Kontrollgruppe. Eine Korrelation der Serumkonzentrationen zu verschiedenen patienten- und tumorspezifischen Parametern, insbesondere zum CEA und Metastasenstatus, wurden dargestellt. Ein Zusammenhang mit der Tumoraktivität scheint somit sehr wahrscheinlich zu sein. Die Serumkonzentrationen des löslichen HER-2 Fragments und die Gewebeexpression korrelierten jedoch nicht miteinander.

Aufgrund des sehr geringen Anteils einer Gewebeüberexpression des HER-2 im Primärtumor (2/88 Hercept® positiv und CISH positiv) kann vermutet werden, dass das kolorektale Karzinom kein geeigneter Tumor für eine anti-HER-2 gerichtete Therapie ist.

Sehr eindrucksvoll und zugleich als Hauptergebnis der Analysen zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Serum-HER-2 Konzentration und dem Gesamtüberleben der Patienten. Ein erhöhter HER-2 Serumwert korrelierte hoch signifikant mit einer schlechteren Prognose für den Patienten. Diese Rolle als prognostischer Faktor macht das lösliche HER-2 für die Therapieplanung und Verlaufskontrolle bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen interessant.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) HJ Schmoll: Kolorektales Karzinom. In: HJ Schmoll, K Höffken and K Possinger (Hrsg): Kompendium Internistische Onkologie. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1999, S. 941-1039
- 2) N Becker and J Wahrendorf: Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. 3. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
- 3) H Boeing and J Wahrendorf: [Epidemiology of colorectal cancers]. Internist (Berl) 32 (1991) 306-314
- 4) AW Hsing, JK McLaughlin, WH Chow, LM Schuman, HT Co Chien, G Gridley, E Bjelke, S Wacholder and WJ Blot: Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. Int J Cancer 77 (1998) 549-553
- 5) A Schalhorn, M Siebeck, R Bumm, M Gross, B Günther, MM Heiss, FT Huber, R Lamerz, U Lau-Werner, C Lersch, JD Roder, M Sackmann, R DSander, P Stieber, H Waldner, B Weber, B Wiebecke and WG Zoller: Kolonkarzinome. In: MM Heiss (Hrsg): Manual, Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt, Berlin, Wien, New York, 2001, S. 215-243
- 6) F Macrae: Epidemiology and early detection of colorectal cancer. Curr Opin Oncol 3 (1991) 711-718
- 7) A Ekobom, C Helmick, M Zack and HO Adami: Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. Lancet 336 (1990) 357-359
- 8) JR Jass and LH Sobin: Histological typing of intestinal tumours. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1989
- 9) A Schalhorn and K-W Jauch: Kolorektale Karzinome. In: W Wilmanns, D Huhn and K Wilms (Hrsg): Internistische Onkologie. Thieme, New York, 1994, S. 516-538
- 10) P Lavin, A Mittelman, H Douglass, Jr., P Engstrom and D Klaassen: Survival and response to chemotherapy for advanced colorectal adenocarcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group report. Cancer 46 (1980) 1536-1543
- 11) JE Allison, R Feldman and IS Tekawa: Hemoccult screening in detecting colorectal neoplasm: sensitivity, specificity, and predictive value. Long-term follow-up in a large group practice setting. Ann Intern Med 112 (1990) 328-333
- 12) B Vogelstein, ER Fearon, SR Hamilton, SE Kern, AC Preisinger, M Leppert, Y Nakamura, R White, AM Smits and JL Bos: Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319 (1988) 525-532

- 13) R Lev and M Lee: Colorectal Carcinoma. In: K Anil and M Rustgi (Hrsg): *Gastrointestinal Cancer: Biology, Diagnosis and Therapy*. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1995, S. 379-398
- 14) J Dunst and R Sauer: [The adjuvant therapy of rectal carcinoma: its current status]. In: (Hrsg): *Strahlenther Onkol*. 1994, S. 375-382
- 15) HJ Schmoll: [Adjuvant chemotherapy in rectal cancer]. *Chirurg* 65 (1994) 576-584
- 16) P Hermanek: Kolon und Rektum. In: U Dold, P Hermanek, K Höffken and H Sack (Hrsg): *Praktische Tumorthherapie*. Thieme, New York, 1993, S. 250-267
- 17) FP Gall and P Hermanek: [Change and current status of surgical treatment of colorectal cancer. Report of experiences of the Erlangen Surgical University Clinic]. *Chirurg* 63 (1992) 227-234
- 18) EC Hobday TJ: Adjuvant therapy of colon cancer: a review. *Clin Colorectal Cancer* 1 (4) (2002) 230-236
- 19) W Schwenk and W Stock: [Effectiveness of regular after-care in R0-resected rectal carcinoma]. *Zentralbl Chir* 119 (1994) 805-811; discussion 812-803
- 20) D Spiegel, JR Bloom, HC Kraemer and E Gottheil: Effect of psychosocial treatment on survival of patients with metastatic breast cancer. *Lancet* 2 (1989) 888-891
- 21) RW Burt, DT Bishop, RG Lee, LC Albright and MH Skolnick: Inheritance of colonic adenomatous polyps and colorectal cancer. *Prog Clin Biol Res* 279 (1988) 189-194
- 22) BS Danes, EJ Gardner and M Lipkin: Studies on the identification of genetic risk for heritable colon cancer. *Cancer Detect Prev* 8 (1985) 349-365
- 23) SZ Kussin, M Lipkin and SJ Winawer: Inherited colon cancer: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 72 (1979) 448-457
- 24) HT Lynch, P Watson, SJ Lanspa, J Marcus, T Smyrk, RJ Fitzgibbons, Jr., M Krieglner and JF Lynch: Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 31 (1988) 439-444
- 25) MJ O'Brien, SJ Winawer, AG Zauber, LS Gottlieb, SS Sternberg, B Diaz, GR Dickersin, S Ewing, S Geller, D Kasimian and et al.: The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98 (1990) 371-379
- 26) JL Bos, ER Fearon, SR Hamilton, M Verlaan-de Vries, JH van Boom, AJ van der Eb and B Vogelstein: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 (1987) 293-297
- 27) K Forrester, C Almoguera, K Han, WE Grizzle and M Perucho: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327 (1987) 298-303

- 28) B Lewin: Molekularbiologie der Gene. Aufl. Spektrum, Heidelberg Berlin, 1998
- 29) JM Bishop: Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem* 52 (1983) 301-354
- 30) U Eppenberger: New aspects in the molecular growth regulation of mammary tumors. *Recent Results Cancer Res* 113 (1989) 1-3
- 31) AG Knudson, Jr.: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45 (1985) 1437-1443
- 32) H Land, LF Parada and RA Weinberg: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222 (1983) 771-778
- 33) JM Bishop: The molecular genetics of cancer. *Science* 235 (1987) 305-311
- 34) S Chan and K Sikora: The potential of oncogene products as tumour markers. *Cancer Surv* 6 (1987) 185-207
- 35) CR King, MH Kraus and SA Aaronson: Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229 (1985) 974-976
- 36) L Coussens, TL Yang-Feng, YC Liao, E Chen, A Gray, J McGrath, PH Seeburg, TA Libermann, J Schlessinger, U Francke and et al.: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230 (1985) 1132-1139
- 37) K Semba, N Kamata, K Toyoshima and T Yamamoto: A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 6497-6501
- 38) AL Schechter, MC Hung, L Vaidyanathan, RA Weinberg, TL Yang-Feng, U Francke, A Ullrich and L Coussens: The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229 (1985) 976-978
- 39) AL Schechter, DF Stern, L Vaidyanathan, SJ Decker, JA Drebin, MI Greene and RA Weinberg: The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312 (1984) 513-516
- 40) S Fukushige, K Matsubara, M Yoshida, M Sasaki, T Suzuki, K Semba, K Toyoshima and T Yamamoto: Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 955-958
- 41) T Akiyama, C Sudo, H Ogawara, K Toyoshima and T Yamamoto: The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232 (1986) 1644-1646
- 42) CI Bargmann, MC Hung and RA Weinberg: Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45 (1986) 649-657

- 43) CI Bargmann, MC Hung and RA Weinberg: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319 (1986) 226-230
- 44) T Yamamoto, S Ikawa, T Akiyama, K Semba, N Nomura, N Miyajima, T Saito and K Toyoshima: Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319 (1986) 230-234
- 45) PG Natali, MR Nicotra, A Bigotti, I Venturo, DJ Slamon, BM Fendly and A Ullrich: Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 45 (1990) 457-461
- 46) MF Press, C Cordon-Cardo and DJ Slamon: Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5 (1990) 953-962
- 47) RM Neve, HA Lane and NE Hynes: The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S9-13
- 48) WJ Gullick, MS Berger, PL Bennett, JB Rothbard and MD Waterfield: Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells. *Int J Cancer* 40 (1987) 246-254
- 49) DJ Slamon, GM Clark, SG Wong, WJ Levin, A Ullrich and WL McGuire: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-182
- 50) J Baselga: Is Circulating HER-2 More Than Just a Tumor Marker? *Clinical Cancer Research* 7 (2001) 2605-2607
- 51) WC Dougall, X Qian, NC Peterson, MJ Miller, A Samanta and MI Greene: The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* 9 (1994) 2109-2123
- 52) I Rubin and Y Yarden: The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S3-8
- 53) NE Hynes: The ERB-B family of receptor tyrosine kinases: Their role in cancer development and as targets for therapy. *Eur J Cancer* 33 (1997) 144
- 54) R Lupu, R Colomer, G Zugmaier, J Sarup, M Shepard, D Slamon and ME Lippman: Direct interaction of a ligand for the erbB2 oncogene product with the EGF receptor and p185erbB2. *Science* 249 (1990) 1552-1555
- 55) E Peles, SS Bacus, RA Koski, HS Lu, D Wen, SG Ogden, RB Levy and Y Yarden: Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69 (1992) 205-216
- 56) Y Yarden: Growth factors and ErbB/HER tyrosine kinases: How do they contribute to malignancy? *Eur J Cancer* 33 (1997) 223
- 57) MX Sliwkowski, JA Lofgren, GD Lewis, TE Hotaling, BM Fendly and JA Fox: Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26 (1999) 60-70

- 58) JC Lee, ST Wang, NH Chow and HB Yang: Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer* 38 (2002) 1065-1071
- 59) M Mitze, T Beck, W Weikel, H Rosenthal and PG Knapstein: [Significance of neu-protein for prognosis of breast cancers]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 50 (1990) 771-776
- 60) DF Hayes, W Carney, C Tondini, D Petit and DW Kufe: Elevated circulating c-neu oncogene product in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment* 14 (1989) 135
- 61) R Molina, J Jo, X Filella, J Bruix, A Castells, M Hague and AM Ballesta: Serum levels of C-erbB-2 (HER-2/neu) in patients with malignant and non-malignant diseases. *Tumour Biol* 18 (1997) 188-196
- 62) D Luftner, S Schnabel and K Possinger: c-erbB-2 in serum of patients receiving fractionated paclitaxel chemotherapy. *Int J Biol Markers* 14 (1999) 55-59
- 63) SM Pupa, S Menard, D Morelli, B Pozzi, G De Palo and MI Colnaghi: The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8 (1993) 2917-2923
- 64) YZ Lin and GM Clinton: A soluble protein related to the HER-2 proto-oncogene product is released from human breast carcinoma cells. *Oncogene* 6 (1991) 639-643
- 65) SM Pupa, S Menard, S Andreola and MI Colnaghi: Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. *Cancer Res* 53 (1993) 5864-5866
- 66) T Brodowicz, C Wiltschke, AC Budinsky, M Krainer, GG Steger and CC Zielinski: Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 73 (1997) 875-879
- 67) JJ Isola, K Holli, H Oksa, Y Teramoto and OP Kallioniemi: Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer. *Cancer* 73 (1994) 652-658
- 68) H Kandl, L Seymour and WR Bezwoda: Soluble c-erbB-2 fragment in serum correlates with disease stage and predicts for shortened survival in patients with early-stage and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 70 (1994) 739-742
- 69) R Kath, K Hoffken, C Otte, K Metz, ME Scheulen, F Hulskamp and S Seeber: The neu-oncogene product in serum and tissue of patients with breast carcinoma. *Ann Oncol* 4 (1993) 585-590
- 70) OA Mansour, AR Zekri, J Harvey, Y Teramoto and O el-Ahmady: Tissue and serum c-erbB-2 and tissue EGFR in breast carcinoma: three years follow-up. *Anticancer Res* 17 (1997) 3101-3106

- 71) W Vogel, R Kath, H Kosmehl, E Olschowsky and K Hoffken: The neu oncogene product in serum and tissue of patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 122 (1996) 118-121
- 72) AC Polychronidis, AK Tsaroucha, SK Anagnostoulis, EE Efstathiou, PG Georgiadis and CE Simopoulos: Serum levels of c-erbB-2 correlate with advanced stage and liver metastasis in colorectal cancer. *Folia Med (Plovdiv)* 45 (2003) 12-16
- 73) DJ Slamon, W Godolphin, LA Jones, JA Holt, SG Wong, DE Keith, WJ Levin, SG Stuart, J Udove, A Ullrich and et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (1989) 707-712
- 74) AD Thor, LH Schwartz, FC Koerner, SM Edgerton, SJ Skates, S Yin, SJ McKenzie, DL Panicali, PJ Marks, HJ Fingert and et al.: Analysis of c-erbB-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res* 49 (1989) 7147-7152
- 75) Y Yamada, M Yoshimoto, Y Murayama, M Ebuchi, S Mori, T Yamamoto, H Sugano and K Toyoshima: Association of elevated expression of the c-erbB-2 protein with spread of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 80 (1989) 1192-1198
- 76) S Paik, R Hazan, ER Fisher, RE Sass, B Fisher, C Redmond, J Schlessinger, ME Lippman and CR King: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 8 (1990) 103-112
- 77) AK Tandon, GM Clark, GC Chamness, A Ullrich and WL McGuire: HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 7 (1989) 1120-1128
- 78) SS Bacus, JW Bacus, DJ Slamon and MF Press: HER-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 114 (1990) 164-169
- 79) RA Walker, WJ Gullick and JM Varley: An evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 60 (1989) 426-429
- 80) C Wright, B Angus, S Nicholson, JR Sainsbury, J Cairns, WJ Gullick, P Kelly, AL Harris and CH Horne: Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res* 49 (1989) 2087-2090
- 81) AD Thor, S Liu, S Edgerton, D Moore, 2nd, KM Kasowitz, CC Benz, DF Stern and MP DiGiovanna: Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3230-3239
- 82) A Pich, E Margaria and L Chiusa: Oncogenes and male breast carcinoma: c-erbB-2 and p53 coexpression predicts a poor survival. *J Clin Oncol* 18 (2000) 2948-2956
- 83) AD Thor, SM Edgerton, S Liu, DH Moore, 2nd and DJ Kwiatkowski: Gelsolin as a negative prognostic factor and effector of motility in erbB-2-positive

- epidermal growth factor receptor-positive breast cancers. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2415-2424
- 84) Y Nieto, PJ Cagnoni, S Nawaz, EJ Shpall, R Yerushalmi, B Cook, P Russell, J McDermit, J Murphy, SI Bearman and RB Jones: Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 18 (2000) 2070-2080
 - 85) B Shpitz, Y Bomstein, A Sternberg, E Klein, S Liverant, G Groisman and J Bernheim: Angiogenesis, p53, and c-erbB-2 immunoreactivity and clinicopathological features in male breast cancer. *J Surg Oncol* 75 (2000) 252-257
 - 86) T Cooke, J Reeves, A Lanigan and P Stanton: HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S23-28
 - 87) J Baselga and J Albanell: Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S35-41
 - 88) MJ Piccart: Proposed treatment guidelines for HER2-positive metastatic breast cancer in Europe. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S89-94
 - 89) BA Gusterson, LG Machin, WJ Gullick, NM Gibbs, TJ Powles, C Elliott, S Ashley, P Monaghan and S Harrison: c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 58 (1988) 453-457
 - 90) C Shimizu, T Fukutomi, H Tsuda, S Akashi-Tanaka, T Watanabe, T Nanasawa and K Sugihara: c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. *J Surg Oncol* 73 (2000) 17-20
 - 91) DJ Venter, NL Tuzi, S Kumar and WJ Gullick: Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2 (1987) 69-72
 - 92) K Friedrichs, W Jonat, J Meybohm and S Singh: [Oncogene organization and expression in breast cancer exemplified by proto-oncogene c-erb B2]. *Arch Gynecol Obstet* 245 (1989) 658-660
 - 93) MS Berger, GW Locher, S Saurer, WJ Gullick, MD Waterfield, B Groner and NE Hynes: Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 48 (1988) 1238-1243
 - 94) A Lichtenstein, J Berenson, JF Gera, K Waldburger, O Martinez-Maza and JS Berek: Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor and lymphokine-activated killer cells: correlation with expression of HER2/neu oncogenes. *Cancer Res* 50 (1990) 7364-7370
 - 95) S Sleijfer, JG Asschert, H Timmer-Bosscha and NH Mulder: Enhanced sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in doxorubicin-resistant tumor cell lines due to down-regulated c-erbB2. *Int J Cancer* 77 (1998) 101-106

- 96) MD Pegram, A Lipton, DF Hayes, BL Weber, JM Baselga, D Tripathy, D Baly, SA Baughman, T Twaddell, JA Glaspy and DJ Slamon: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 16 (1998) 2659-2671
- 97) P Carter, L Presta, CM Gorman, JB Ridgway, D Henner, WL Wong, AM Rowland, C Kotts, ME Carver and HM Shepard: Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 4285-4289
- 98) NJ Nelson: Can HER2 status predict response to cancer therapy? *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 366-367
- 99) MD Pegram, G Pauletti and DJ Slamon: HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1998) 65-77
- 100) H Kunisue, J Kurebayashi, T Otsuki, CK Tang, M Kurosumi, S Yamamoto, K Tanaka, H Doihara, N Shimizu and H Sonoo: Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2. *Br J Cancer* 82 (2000) 46-51
- 101) K Possinger and P Schmid: Neue Substanzen zur Therapie des Mammakarzinoms: Standards auf dem Prüfstand. *Onkologe* 6 (2000) 392-409
- 102) BC Langton, K Tran, J Jackson, S Knapp, A Gannon, Y Teramoto, M Huston, A Chan and M Hancock: The development and characterization of antibodies to different regions of the c-erbB-2 protein on breast tumor tissue and cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Baltimore, (1989) S. 352
- 103) A Dursun, A Poyraz, B Celik and G Akyol: Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: correlation with histopathologic characteristics and analysis of Ki-67. *Pathol Oncol Res* 5 (1999) 104-106
- 104) S Gurel, E Dolar, O Yerci, B Samli, H Ozturk, SG Nak, M Gulden and F Memik: The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological factors in gastric cancer. *J Int Med Res* 27 (1999) 74-78
- 105) T Ishikawa, M Kobayashi, M Mai, T Suzuki and A Ooi: Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 151 (1997) 761-768
- 106) Y Noguchi, A Tsuburaya, T Makino, K Fukuzawa, K Nomura, T Yoshikawa, T Imada, T Amano and A Matsumoto: Predictive value of c-erbB-2 and DNA ploidy patterns in gastric carcinoma recurrence. *Int Surg* 78 (1993) 107-111
- 107) JP Kim, ST Oh, TS Hwang and JG Chi: The prognostic significance of c-erbB-2 and p53 protein expressions in gastric carcinoma--a multivariate analysis of prognostic factors. *J Korean Med Sci* 9 (1994) 248-253

- 108) K Motojima, J Furui, N Kohara, K Izawa, T Kanematsu and H Shiku: erbB-2 expression in well-differentiated adenocarcinoma of the stomach predicts shorter survival after curative resection. *Surgery* 115 (1994) 349-354
- 109) T Sato, K Abe, A Kurose, N Uesugi, T Todoroki and K Sasaki: Amplification of the c-erbB-2 gene detected by FISH in gastric cancers. *Pathol Int* 47 (1997) 179-182
- 110) S Uchino, H Tsuda, K Maruyama, T Kinoshita, M Sasako, T Saito, M Kobayashi and S Hirohashi: Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 72 (1993) 3179-3184
- 111) T Kameda, W Yasui, K Yoshida, T Tsujino, H Nakayama, M Ito, H Ito and E Tahara: Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res* 50 (1990) 8002-8009
- 112) Y Yonemura, I Ninomiya, A Yamaguchi, S Fushida, H Kimura, S Ohoyama, I Miyazaki, Y Endou, M Tanaka and T Sasaki: Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 51 (1991) 1034-1038
- 113) H Allgayer, R Babic, KU Gruetzner, A Tarabichi, FW Schildberg and MM Heiss: c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 18 (2000) 2201-2209
- 114) S Kapitanovic, S Radosevic, M Kapitanovic, S Andelinovic, Z Ferencic, M Tavassoli, D Primorac, Z Sonicki, S Spaventi, K Pavelic and R Spaventi: The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 112 (1997) 1103-1113
- 115) J Hu, Z Wang and Y Jiang: [Relations between p53 and p185 expression and prognosis of patients with colon cancers]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18 (1996) 247-249
- 116) YP Wang, SQ Chen and KX Xue: [Amplification of C-erbB-2 oncogene in colon carcinomas]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 74 (1994) 536-538, 582
- 117) S Yamaguchi, S Ohki, T Jo, S Imai, K Matsuo, Y Hamahata, M Fukano, S Tokito, S Hasegawa, H Masui and et al.: [Expression of c-erbB-2 protein and vessel invasion in colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 19 (1992) 34-39
- 118) MC Dugan, ST Dergham, R Kucway, K Singh, L Biernat, W Du, VK Vaitkevicius, JD Crissman and FH Sarkar: HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 14 (1997) 229-236
- 119) ST Dergham, MC Dugan, P Arlauskas, W Du, VK Vaitkevicius, JD Crissman and FH Sarkar: Relationship of family cancer history to the expression of p53, p21WAF-1, HER-2/neu, and K-ras mutation in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 21 (1997) 225-234

- 120) S Lei, HE Appert, B Nakata, DR Domenico, K Kim and JM Howard: Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival. *Int J Pancreatol* 17 (1995) 15-21
- 121) HE Zhau, X Zhang, AC von Eschenbach, K Scorsone, RJ Babaian, JY Ro and MC Hung: Amplification and expression of the c-erb B-2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Mol Carcinog* 3 (1990) 254-257
- 122) JI Ohta, Y Miyoshi, H Uemura, K Fujinami, K Mikata, M Hosaka, Y Tokita and Y Kubota: Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 2463-2467
- 123) JA Kern, DA Schwartz, JE Nordberg, DB Weiner, MI Greene, L Torney and RA Robinson: p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 50 (1990) 5184-5187
- 124) DB Weiner, J Nordberg, R Robinson, PC Nowell, A Gazdar, MI Greene, WV Williams, JA Cohen and JA Kern: Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50 (1990) 421-425
- 125) DH Harpole, Jr., JR Marks, WG Richards, JE Herndon, 2nd and DJ Sugarbaker: Localized adenocarcinoma of the lung: oncogene expression of erbB-2 and p53 in 150 patients. *Clin Cancer Res* 1 (1995) 659-664
- 126) G Selvaggi, GV Scagliotti, V Torri, S Novello, E Leonardo, S Cappia, C Mossetti, F Ardisson, P Lausi and P Borasio: HER-2/neu overexpression in patients with radically resected nonsmall cell lung carcinoma. Impact on long-term survival. *Cancer* 94 (2002) 2669-2674
- 127) JL Ware, SJ Maygarden, WW Koontz and SC Strom: Differential reactivity with anti-c-erbB-2 antiserum among human malignant and benign prostatic tissue, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Baltimore, (1989) S. 437
- 128) NJ Nelson: Experts debate value of HER2 testing methods. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 292-294
- 129) G Pauletti, S Dandekar, H Rong, L Ramos, H Peng, R Seshadri and DJ Slamon: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18 (2000) 3651-3664
- 130) S Mori, Y Mori, T Mukaiyama, Y Yamada, Y Sonobe, H Matsushita, G Sakamoto, T Akiyama, M Ogawa, M Shiraishi and et al.: In vitro and in vivo release of soluble erbB-2 protein from human carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 81 (1990) 489-494
- 131) B Kynast, L Binder, D Marx, B Zoll, M Oellerich, HJ Schmoll and A Schauer: p185-Überexpression beim Mammakarzinom. Nachweis mit ICA und ELISA. In: U Löhrs (Hrsg): *Verh Dtsch Ges Path.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena, New York, 1992, S. 278

- 132) B Kynast, L Binder, D Marx, B Zoll, HJ Schmoll, M Oellerich and A Schauer: Determination of a fragment of the c-erbB-2 translational product p185 in serum of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 119 (1993) 249-252
- 133) M Krainer, T Brodowicz, R Zeillinger, C Wiltschke, C Scholten, M Seifert, E Kubista and CC Zielinski: Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. *Oncology* 54 (1997) 475-481
- 134) GH Volas, K Leitzel, Y Teramoto, H Grossberg, L Demers and A Lipton: Serial serum c-erbB-2 levels in patients with breast carcinoma. *Cancer* 78 (1996) 267-272
- 135) M Shelly, R Pinkas-Kramarski, BC Guarino, H Waterman, LM Wang, L Lyass, M Alimandi, A Kuo, SS Bacus, JH Pierce, GC Andrews and Y Yarden: Epregrulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem* 273 (1998) 10496-10505
- 136) Z Zhou, D Wan and C Zhang: Expression level of c-erbB-2 protein correlates with the prognosis of patients with colorectal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 23 (2001) 139-141
- 137) I Genentech: FDA advisory committee recommends approval of first monoclonal antibody for metastatic breast cancer. In: (Hrsg): Media Release 1998 Sep. 2. 1998, S.
- 138) NS Goldstein and M Armin: Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92 (2001) 1331-1346

7. Thesen

1. Dem kolorektalen Karzinom kommt aufgrund seiner Häufigkeit und seiner ansteigenden Inzidenz wachsende Bedeutung zu.
2. Beim Mammakarzinom ist der Zusammenhang zwischen HER-2 Überexpression und schlechter Prognose bekannt.
3. HER-2 wird beim Mammakarzinom bereits seit einiger Zeit als Prognosefaktor, Verlaufsparemeter und Target für eine spezifische Antikörpertherapie (Herceptin®) genutzt.
4. Ziel der Arbeit war es, die tumorbiologische Relevanz, die Bedeutung als Prognosefaktor und die Korrelation der HER-2 Serumkonzentration mit der Gewebeexpression und anderen Parametern beim kolorektalen Karzinom zu untersuchen.
5. Im Serum des Patientenkollektivs konnte eine eindeutig höhere HER-2 Konzentration gemessen werden als in der Kontrollgruppe.
6. Die Serum-HER-2 Konzentrationen der kolorektalen Karzinome korrelierten signifikant mit CEA, Bilirubin, der Anwesenheit von Lebermetastasen, alkalischer Phosphatase und dem Chemotherapiestatus.
7. Bei allen Patienten ohne Fernmetastasen konnte ein Serum-Her-2 Wert <3000 HNU/ml detektiert werden.
8. Patienten mit einer niedrigen Serum-HER-2 Konzentration haben eine bessere Prognose hinsichtlich ihrer Gesamtüberlebenszeit. Jedoch korrelieren LDH und CEA signifikanter mit der Überlebenszeit als die Serum-HER-2 Konzentration.
9. Insgesamt gibt es unter den kolorektalen Karzinomen nur einen sehr geringen Anteil von Tumoren, die eine HER-2 Überexpression im Primärtumor aufzeigen und von denen zeigen wiederum nur ein geringer Anteil eine Genamplifikation in der CISH.
10. Die HER-2 Gewebeexpressionen korrelieren signifikant mit der alkalischen Phosphatase und der Anwesenheit von Lebermetastasen.
11. Es konnte keine Korrelation zwischen Gewebeexpression und Serumkonzentration nachgewiesen werden.
12. Der HER-2 Rezeptor im Gewebe von kolorektalen Karzinomen scheint insgesamt kein lohnendes Target für eine anti-HER-2 gerichtete Therapie zu sein.
13. Die Serum-HER-2 Konzentration ist als Prognosefaktor und eventuell als Verlaufsparemeter beim kolorektalen Karzinom geeignet.

PUBLIKATIONEN VON ERGEBNISSEN DER ARBEIT

Poster

Benecke M, Frühauf A, Holzhausen HJ, Schmoll HJ, Grothey A: Prognostic significance of serum levels and tumor expression of HER-2 in colorectal cancer (CRC); 93rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), San Francisco, California, USA, 06-10 April 2002 – Proceedings; hrsg. V. AACR, o. Verlag, S. 216 #1081

Benecke, M., A. Fruehauf, et al. (2001). "Serum levels and tumor expression of HER-2 in colorectal cancer (CRC) - a prospective analysis." Eur J Cancer 37 (Suppl 6): S306, abstr. 1132.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Schmoll für die Überlassung dieses Themas sowie Herrn OA Dr. Grothey für die herzliche Betreuung und fachliche/tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke dem Personal des IDL-Labors der Uni-Klinik Halle-Kröllwitz besonders Frau Dipl.-Chem. A. Frühauf für die gewissenhafte und geduldige Betreuung/Durchführung der ELISA-Tests.

Weiterhin danke ich den Schwestern der Hämatologisch-Onkologischen Ambulanz in Halle-Kröllwitz für die fleißige und freundliche Unterstützung beim sammeln der zahlreichen Blutproben.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Holzhausen für die kompetente und stets freundliche Unterstützung bei der Auswertung der IHC- und CISH-Gewebeanfärbungen.

In diesem Zusammenhang danke ich auch den Mitarbeitern aus dem Labor des Pathologischen Instituts der Martin-Luther-Universität für die Betreuung/Durchführung der IHC- und CISH-Gewebeanfärbungen.

Schließlich gilt mein Dank der Firma Hoffman-La Roche für den finanziellen Background bei der Beschaffung aller notwendigen Materialien und die Möglichkeit, diese Arbeit auf dem AACR 2002 zu präsentieren.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Benecke
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 16. 11. 1977
Geburtsort: Dessau
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984 – 1991 Grundsichule (POS) „Friedensschule“ in Dessau
1991 – 1996 Gymnasium „Fürst – Franz“ in Dessau
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1. Sanitätsbataillon Hildesheim
(10/1996 – 08/1997)

Hochschulbildung

Seit 10/1997 Studium der Medizin an der Martin-Luther-
Universität Halle/Wittenberg
08/1999 Vorklinische Prüfung
08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen
02/1999 – 03/1999 Chirurgie in der Diakonissenanstalt Dessau
03/2000 Hämatologisch-Onkologische Ambulanz der
Universitätsklinik Halle/Kröllwitz
02/2001 – 03/2001 Geriatrie in der Diakonissenanstalt Halle
03/2002 Anästhesie in der „University of Crete“ in
Heraklion (Griechenland/Kreta)

09/2002 Orthopädische Klinik des „St. Lukes Hospital“ in Valletta (Malta)

Abschnitte des Praktischen Jahres

04/2003 – 08/2003 Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie in Diakonissenanstalt Halle

08/2003 - 11/2003 Innere Medizin in den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Halle-Bergmannstrost

11/2003 – 03/2004 Universitätsklinik und Poliklinik für Psychotherapie und in Halle Psychosomatik

Dissertation

2000-2004 Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin (Abteilung für Hämatologie/Onkologie)
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll
Betreuer: OA Dr. med. A. Grothey

Berufliche Nebentätigkeit

seit 1999 Tätigkeit im Pflegedienst der Diakonissenanstalt Halle (Akut-Geriatrie, Innere Medizin)

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

(Matthias Benecke)