

**Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

**Bestimmung des HER-2/neu-Status an
Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen
mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) –
Validierung der Ergebnisse durch Vergleich mit
konventionellen Paraffinschnitten und einem
Gewebe-multiblockschnitt**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Regine Arnold**

**aus
Stuttgart**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wallwiener

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. HER-2/neu-Protoonkogen und HER-2/neu Rezeptor	2
1.2. HER-2/neu-Onkogen	5
1.3. Prognostischer und prädiktiver Stellenwert einer HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression	7
1.4. Antikörpertherapie des Mammakarzinoms mit Trastuzumab	8
1.5. Methoden zum Nachweis einer HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression	10
1.6. Aktueller Stand der HER-2/neu-Diagnostik des Mammakarzinoms im Hinblick auf eine Therapie mit Trastuzumab	11
1.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten	14
2. Fragestellung	16
3. Material und Methode	17
3.1. Material	17
3.1.1. Gewebeproben und Tumorabklatschpräparate	17
3.1.2. Materialliste	18

3.2. Methode	21
3.2.1. Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	21
3.2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten	25
3.2.3. Prinzip des Gewebemultiblocks	31
3.2.4. Zytokeratin-8 und Prinzip der Zytokeratin-8-Immun- fluoreszenz	32
3.2.5. Doppelmarkierung aus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz am Gewebemultiblock- schnitt	35
3.2.6. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Paraffinschnitten	42
4. Ergebnisse	44
4.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorab- klatschpräparaten	44
4.1.1. Etablierung der Methode an Tumorabklatschpräparaten	44
4.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	45
4.1.3. Dokumentation	46
4.1.4. HER-2/neu-Status nach Vysis	51
4.1.5. HER-2/neu-Status nach Ventana	52
4.1.6. Aneuploidie bei Fällen mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana	53
4.1.7. Aneuploidie bei Fällen mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana	56
4.1.8. Aneuploidie bei Fällen ohne eine Amplifikation nach Ventana	57

4.2. Doppelmarkierung am Gewebemultiblockschnitt	57
4.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	58
4.2.2. HER-2/neu Status nach Vysis	60
4.2.3. Vergleich von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt anhand der Vysis-Ratio	61
4.2.4. HER-2/neu Status nach Ventana	64
4.2.5. Vergleich von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt anhand der Ventana-Klassifizierung	66
4.2.6. Aneuploidie am Gewebemultiblockschnitt	67
4.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten	68
4.3.1. HER-2/neu Status nach Vysis an Paraffinschnitten und Vergleich mit Tumorabklatschpräparaten	68
4.3.2. HER-2/neu Status nach Ventana an Paraffinschnitten und Vergleich mit Tumorabklatschpräparaten	70
5. Diskussion	72
5.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten	73
5.1.1. Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten und deren Vor- und Nachteile	73
5.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tumorabklatschpräparate	74
5.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an der Paraffinhistologie	76
5.2.1. Herstellung und Doppelmarkierung des Gewebemultiblockschnitts	76
5.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Gewebemultiblockschnitts	78

5.3. Nachweis einer HER-2/neu Genamplifikation an Tumorabklatschpräparaten im Vergleich zur Paraffin-histologie	80
5.3.1. Ermittlung des HER-2/neu-Status nach Vysis	80
5.3.2. Ermittlung des HER-2/neu-Status nach Ventana	84
5.3.3. Ermittlung des Aneuploidie-Status	89
5.4. Stellenwert der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten in der HER-2/neu-Diagnostik	91
6. Zusammenfassung	93
Literaturverzeichnis	95
Abbildungsverzeichnis	109
Tabellenverzeichnis	112
Anhang	113
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
CEP	chromosome enumeration DNA probe
CMF	Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil
CNC	computer numerical control
°C	Grad Celsius
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration, USA
FFPE	formalin fixed paraffin embedded, Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
h	hora, Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
HER	human epidermal growth factor receptor
HLA	high level amplification, High-Level-Amplifikation
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LLA	low level amplification, Low-Level-Amplifikation
LSI	locus specific identifier

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mRNA	messenger ribonucleic acid, messenger-Ribonukleinsäure
n	numerus, Gesamtanzahl Fälle
NA	no amplification, keine Amplifikation
NDF	neu differentiation factor
ng	Nanogramm
NP-40	Nonylphenyl-polyethylenglycol-40
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potentia Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction, Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SSC	sodium saline citrate
Tab.	Tabelle
TAP	Tumorabklatschpräparat
TGF α	transforming growth factor α
TMA	Tissue microarray
TNM-Klassifikation	von der International Union Against Cancer (UICC) festgelegte Tumorstadieneinteilung nach der klinisch und histopathologisch bestimmten anatomischen Ausdehnung eines Tumors aufgrund folgender Kriterien: Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen (M)
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in den industrialisierten Ländern. In Deutschland erkranken jährlich über 46.000 Frauen an einem Mammakarzinom (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Für das Jahr 1998 gibt das statistische Bundesamt 17.692 Todesfälle durch Brustkrebs in Gesamtdeutschland an (Statistisches Bundesamt 1998). Anhand dieser epidemiologischen Daten wird die zentrale Bedeutung von optimaler Diagnostik und neuen Therapieansätzen für das Mammakarzinom ersichtlich.

Die Diagnostik des Mammakarzinoms umfasst neben klinischer Untersuchung, bildgebenden Verfahren und verschiedenen Biopsiemethoden die histologische Diagnosesicherung und die Bestimmung von prognostischen und prädiktiven Faktoren. Es handelt sich dabei um validierte Parameter, die den klinischen Verlauf (prognostische Faktoren) und das Ansprechen auf eine spezifische Therapie (prädiktive Faktoren) zuverlässig voraussagen können (Harbeck und Thomssen 2002). Zu diesen zählen Alter, TNM-Status (Tumorgroße, axillärer Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung), Morphologie (histopathologischer Typ, histopathologisches Grading bzw. Tumordifferenzierung, peritumorale Lymphangiosis carcinomatosa/Gefäßinvasion) und Steroidhormonrezeptor-Status (Östrogen- und Progesteronrezeptoren). Diese traditionellen Parameter mit gesicherter klinischer Relevanz sollen obligat bei jeder Patientin mit einem Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Primärtherapie bestimmt werden (Harbeck et al. 2001, Harbeck und Thomssen 2002).

Darüberhinaus gibt es vielversprechende neue tumorbiologische Prognosefaktoren, die morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Aspekte beinhalten. Dazu zählen unter anderem der HER-2/neu-Rezeptor (human epidermal growth factor receptor) und der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) sowie sein Inhibitor (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1/PAI-1). Letztere sind an Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen beteiligt (Andreasen et al. 1997).

1.1. HER-2/neu-Protoonkogen und HER-2/neu-Rezeptor

Das HER-2/neu-Protoonkogen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q12-21.32) lokalisiert und kodiert für einen transmembranen Wachstumsfaktor-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 185 kD (p185) und einer Tyrosinkinase-Aktivität (Akiyama et al. 1986, Coussens et al. 1985, King et al. 1985, Popescu et al. 1989, Schechter et al. 1984, Stern et al. 1986). Dieser wird mit den Rezeptoren, die von den Genen HER-1 (identisch mit EGFR/epidermal growth factor receptor), HER-3 und HER-4 kodiert werden, zur Klasse I der Wachstumsfaktor-Rezeptoren zusammengefasst (Lupu et al. 1995, Rajkumar and Gullick 1994, Tzahar et al. 1996). Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die als Liganden an spezifische zelluläre Rezeptoren wie die der HER-Familie binden und Zellproliferation und -differenzierung fördern (Heldin 1995). Die Aufgabe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren besteht in der Signaltransduktion, d.h. in der Umsetzung dieser extrazellulären Wachstumssignale in intrazelluläre und in der Weiterleitung der Proliferationsreize an den Zellkern (Alroy and Yarden 1997). Somit sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren verantwortlich für die Regulation des Zellzyklus (Leyland-Jones 2001).

Gemeinsames Kennzeichen der HER-Rezeptoren ist ihre große Homologie in Sequenz, Tertiärstruktur und Funktionsprinzip (Rubin and Yarden 2001, Tzahar et al. 1996). Wie in Abbildung 1 (siehe Seite 3) dargestellt, bestehen sie aus einer extrazellulären Domäne zur Interaktion mit dem Liganden, einer lipophilen Transmembrandomäne zur Verankerung in der Zellmembran und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität und terminalem Aminosäurenschwanz (Carpenter 1987, van der Geer et al. 1994, Klapper et al. 2000, Rubin and Yarden 2001). In Letzterem unterscheiden sich die vier HER-Rezeptoren am meisten voneinander (Dougall et al. 1994). Der terminale Aminosäurenschwanz verfügt über spezifische Bindungsstellen für die Zielproteine der jeweiligen Tyrosinkinase. Nur hier gebundene Proteine werden durch die Tyrosinkinase phosphoryliert, so dass die Selektivität der Signaltransduktion gewährleistet ist (Alroy and Yarden 1997, Koch et al. 1991, Margolis et al. 1989, Tzahar et al. 1996).

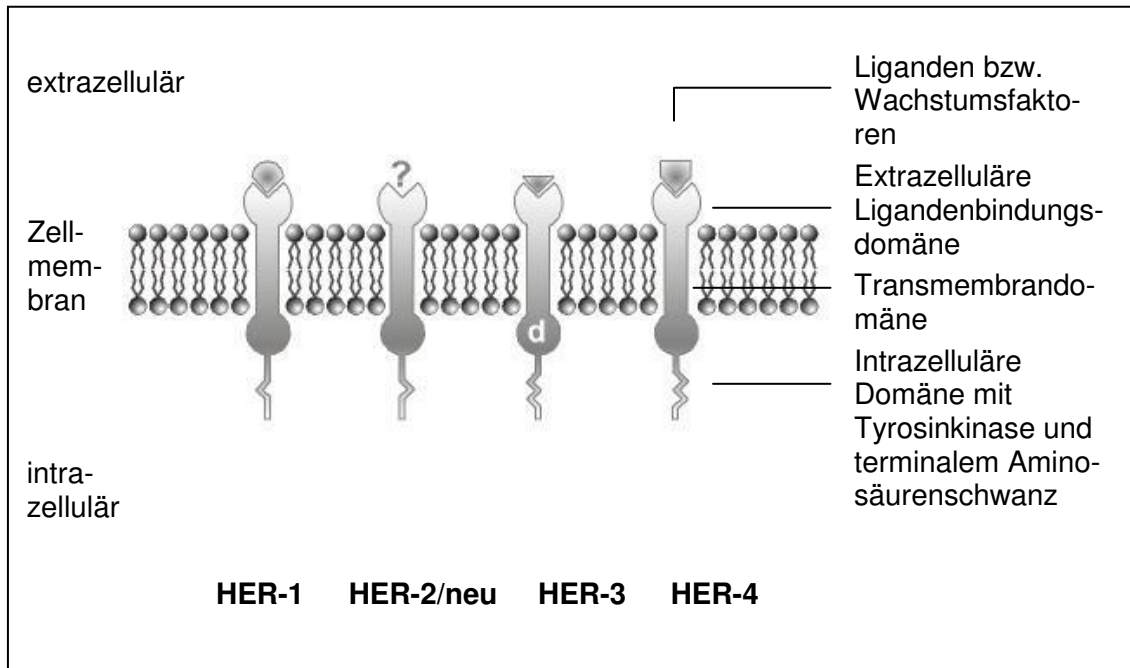


Abb. 1: Schematische Darstellung der vier HER-Rezeptoren

(? = unbekannt; d = defekt)

(modifiziert nach Schaller G (2002) Antikörpertherapie des Mammakarzinoms, 1. Auflage, UNI-MED, Bremen)

Die Rezeptoraktivierung verläuft in vier Teilschritten (siehe Abbildung 2, Seite 4): Bindung eines Wachstumsfaktors bzw. Liganden, Zusammenlagerung von benachbarten HER-Rezeptoren zu Dimeren, Konformationsänderung und Phosphorylierung des Rezeptorkomplexes (Carraway and Cantley 1994, van der Geer et al. 1994). Nach initialer Anlagerung des Wachstumsfaktors an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne bilden sich entweder Homodimere aus zwei gleichartigen oder Heterodimere aus zwei verschiedenen HER-Rezeptoren (Alroy and Yarden 1997). Der Dimerisierungsprozess führt einerseits zur Umlagerung des Rezeptorkomplexes in einen aktiven Konformationszustand, andererseits zur gegenseitigen Phosphorylierung des Tyrosins der beteiligten intrazellulären Domänen (Heldin 1995, Weiss and Schlessinger 1998). Erst der dimere, umgelagerte und phosphorylierte Rezeptorkomplex besitzt volle Tyrosinkinase-Aktivität. Die Tyrosinkinase phosphoryliert und aktiviert ihrerseits die am Carboxylende des terminalen Aminosäureschwanzes gebundenen

spezifischen Transmittermoleküle (Weiss and Schlessinger 1998, Yarden 1990). Auf diese Weise wird die Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt und bewirkt über weitere rezeptorabhängige Phosphorylierungsschritte unterschiedliche Transkriptionsprozesse im Zellkern (Hung and Lau 1999, Wang et al. 2001). Daraus resultiert eine Zunahme von Zellproliferation, -differenzierung und -teilung (Hynes and Stern 1994, Yamauchi et al. 2001).

Proliferationsreiz und Transkriptionsprozesse werden durch Internalisierung des aktivierten Rezeptors beendet. Nach Endozytose in Endosomen werden die Rezeptoren entweder im Sinne eines Recyclings an die Zellmembran zurückbefördert oder in Lysosomen abgebaut (Klapper et al. 2000, Rubin and Yarden 2001).

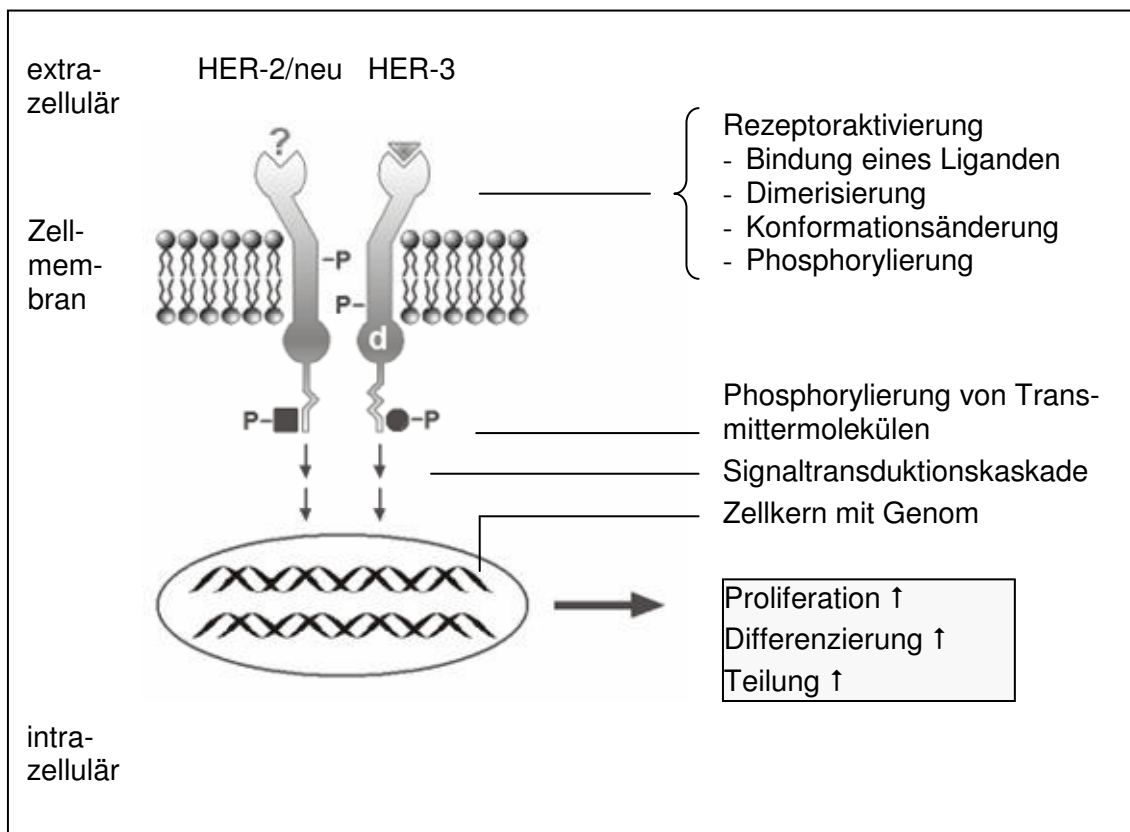


Abb. 2: Schematische Darstellung der HER-2/neu-Rezeptor-Aktivierung

(? = unbekannt; d = defekt)

(modifiziert nach Schaller G (2002) Antikörpertherapie des Mamma-
karzinoms, 1. Auflage, UNI-MED, Bremen)

Für den HER-1-Rezeptor sind folgende 6 Liganden bekannt: EGF (epidermal growth factor), heparin-binding EGF-like growth factor, TGF α (transforming growth factor α), Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin (Alroy and Yarden 1997, Rubin and Yarden 2001). HER-3- und HER-4-Rezeptoren binden NDF (neu differentiation factor) und Heregulin, die zu den Neuregulinen gezählt werden (Alroy and Yarden 1997, Carraway et al. 1994).

Bis heute konnte jedoch kein spezifischer Ligand für den HER-2/neu-Rezeptor nachgewiesen werden (Baulida et al. 1996, Hirashima et al. 2001, Hynes and Stern 1994, Klapper et al. 1999). Vielmehr bildet der HER-2/neu-Rezeptor Heterodimere mit anderen HER-Rezeptoren, die bereits einen Liganden gebunden haben, und wird durch konsekutive Transphosphorylierung aktiviert (Graus-Porta et al. 1995, Klapper et al. 2000, Wada et al. 1990).

Die Interaktion unter den HER-Rezeptoren ist nicht zufällig. Sie folgt einem hierarchischen Prinzip mit einer zentralen Position für den HER-2/neu-Rezeptor. Durch den Dimerisierungsprozess wird anstatt vier linearer Signaltransduktionswege ein komplexes Netzwerk zur Weiterleitung peripherer Impulse aufgebaut (Rubin and Yarden 2001, Tzahar et al. 1996). Dabei überwiegen Heterodimere aus HER-2/neu- und HER-3-Rezeptoren vermutlich aufgrund des fehlenden Liganden einerseits und der defekten Tyrosinkinase andererseits (Guy et al. 1994, Pinkas-Kramarski et al. 1998, Tzahar et al. 1996). Alle Heterodimere mit Beteiligung des HER-2/neu-Rezeptors zeichnen sich durch eine verstärkte und verlängerte Signaltransduktion aus, die auf eine langsamere Dissoziation des Liganden und auf eine verzögerte Internalisierung des Rezeptorkomplexes zurückzuführen ist (Alroy and Yarden 1997, Baulida et al. 1996, Graus-Porta et al. 1995, Klapper et al. 2000, Sliwkowski et al. 1994).

1.2. HER-2/neu-Onkogen

Mutation und Amplifikation einzelner Gene, Chromosomen-Translokation bzw. -Deletion und andere Mechanismen führen zu verschiedenen Genom-

veränderungen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Malignomen spielen (Bièche and Lidereau 1995, Devilee and Cornelisse 1994, van de Vijver 1993). Durch Genamplifikation, d.h. durch Vervielfachung der beiden Genkopien des diploiden Chromosomensatzes, kommt es in erster Linie zur Aktivierung von Protoonkogenen und damit zur Entstehung von Onkogenen, die Tumorigenese und Tumorprogression fördern (Grushko et al. 2002).

Ein Beispiel dafür ist das HER-2/neu-Onkogen, das erstmalig bei Transfektionsversuchen mit Neuroglioblastom-Zellen von Ratten identifiziert wurde und daher die Zusatzbezeichnung „neu“ erhielt (Padhy et al. 1982, Shih et al. 1981). Unabhängig davon gelang es verschiedenen Forschergruppen, das identische menschliche Gen zu klonieren (Coussens et al. 1985, Semba et al. 1985). Die Aktivierung des HER-2/neu-Protoonkogens durch Genamplifikation ist in der Regel mit einer vermehrten Expression des HER-2/neu-Rezeptors auf der Zellmembran assoziiert (Kallioniemi et al. 1992, Lemoine et al. 1990, Thor 2001, Venter et al. 1987). Bei weniger als 10% der Mammakarzinome mit nachweisbarer HER-2/neu-Genamplifikation läßt sich keine HER-2/neu-Überexpression feststellen und umgekehrt liegt in bis zu 10% bei erfassbarer HER-2/neu-Überexpression keine Genamplifikation vor (Jacobs et al. 1999, Lebeau et al. 2001a, Slamon et al. 1989). In letzterem Fall ist eine erhöhte Transkriptionsrate des nicht amplifizierten HER-2/neu-Protoonkogens als Ursache anzusehen (Kallioniemi et al. 1992).

In Abbildung 3 (siehe Seite 7) ist eine normale Zelle einer Tumorzelle mit HER-2/neu-Amplifikation und -Überexpression gegenübergestellt. Während eine normale Zelle über zwei nukleäre Kopien des HER-2/neu-Protoonkogens sowie ca. 20.000 bis 50.000 transmembrane HER-2/neu-Rezeptoren verfügt, können diese Zahlen bei HER-2/neu-positiven Tumorzellen bis auf das 100fache ansteigen (Seshadri et al. 1993, Slamon and Pegram 2001, Venter et al. 1987). Aufgrund dieser hohen Rezeptordichte enthalten Heterodimere häufiger HER-2/neu-Rezeptoren als Dimerisierungspartner. Insbesondere das Vorherrschen von Komplexen aus HER-2/neu- und HER-3-Rezeptoren mit hoher Signalpotenz führt zu gesteigerter Proliferation, Differenzierung und Teilung im Sinne eines malignen Wachstums (Lohrisch and Piccart 2001).

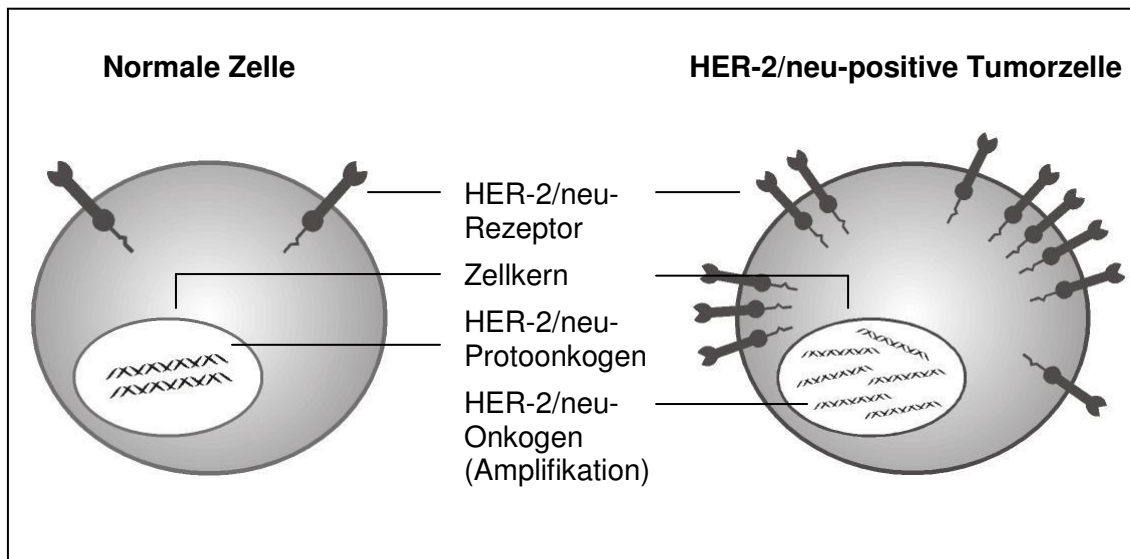


Abb. 3: Gegenüberstellung von normaler Zelle und HER-2/neu-positiver Tumorzelle

(modifiziert nach Schaller G (2002) Antikörpertherapie des Mammakarzinoms, 1. Auflage, UNI-MED, Bremen)

1.3. Prognostischer und prädiktiver Stellenwert einer HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression

Sowohl Genamplifikation als auch Rezeptorüberexpression finden sich in ungefähr 20% bis 30% der Mammakarzinome (Berger et al 1988, Carlomagno et al. 1996, Jacobs et al. 1999, Paik et al. 1990, Ross and Fletcher 1999, Rubin and Yarden 2001, Slamon et al. 1987, Thor 2001) und mit unterschiedlicher Häufigkeit auch bei anderen epithelialen Malignomen wie beispielsweise Ovarial- und Endometriumkarzinomen, Bronchial-, Magen- und Speicheldrüsenkarzinomen (Berchuck et al. 1990, Bongiorno et al. 1994, Falck and Gullick 1989, Hetzel et al. 1992, Kern et al. 1990, Press et al. 1994b, Slamon et al. 1989).

Im Jahr 1987 wurde erstmals die prognostische Bedeutung der HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression beschrieben (Slamon et al. 1987). Die

Frage nach einer unabhängigen prognostischen Relevanz der HER-2/neu-Amplifikation und -Überexpression hinsichtlich eines kürzeren rezidivfreien Intervalls bzw. Gesamtüberlebens wird einerseits bejaht (Berns et al. 1995, Paik et al. 1990, Révillion et al. 1998, Seshadri et al. 1993, Toikkanen et al. 1992), andererseits verneint (Arisio et al. 2000, Clark and McGuire 1991, Driouch et al. 1997, Johnson et al. 2000, Rosen et al. 1995).

Auch hinsichtlich des prädiktiven Stellenwerts einer HER-2/neu-Amplifikation und -Überexpression für Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber Hormon- und Chemotherapie besteht Unklarheit. In verschiedenen Studien wird eine Tamoxifen-Resistenz aufgrund einer Östrogenrezeptor-abhängigen Verstärkung der HER-2/neu-Überexpression unter Hormontherapie beschrieben (Benz et al. 1993, Borg et al. 1994, Carlomagno et al. 1996, Pietras et al. 1995). Andere Studien sehen jedoch keine Assoziation zwischen einer HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression und einer endokrinen Resistenz (Berry et al. 2000, Elledge et al. 1998, Yamauchi et al. 2001). Bei Mammakarzinomen mit HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression scheint das Ansprechen auf eine Chemotherapie nach dem CMF-Schema (Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil) schlechter zu sein als bei anthrazyklinhaltiger Therapie (Hayes and Thor 2002, Paik et al. 2000).

Im Hinblick auf eine Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) ist ein positiver HER-2/neu-Status hingegen ein evidenzbasierter prädiktiver Faktor (Harbeck und Thomssen 2002, Kaufmann und Kanz 2000).

1.4. Antikörpertherapie des Mammakarzinoms mit Trastuzumab

Mit dem rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) steht eine neue vielversprechende Therapieoption des metastasierten Mammakarzinoms mit positivem HER-2/neu-Status zur Verfügung. Als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie ist Trastuzumab seit August 2000

in Deutschland zugelassen (Schaller und Untch 2002). Durch den Einsatz von Trastuzumab läßt sich beim metastasierten Mammakarzinom erstmals eine signifikante Verlängerung von rezidivfreiem und Gesamtüberleben erreichen (Baselga et al. 1996, Cobleigh et al. 1999, Slamon et al. 2001). In der amerikanischen Zulassungsstudie (Phase II-Studie, H0649g) zur Trastuzumab-Monotherapie beim vorbehandelten metastasierten Mammakarzinom betrug die Gesamtansprechrates 15% mit einer mittleren Remissionsdauer von 9,1 Monaten (Cobleigh et al. 1999). Der klinische Nutzen einer adjuvanten Trastuzumab-Therapie wird derzeit in verschiedenen Studien wie beispielsweise der HERA-Studie (Herceptin® Adjuvant Trail) europaweit geprüft.

Im Gegensatz zur klassischen onkologischen Chemotherapie mit unspezifischer antiproliferativer Wirkung und erheblichen Nebenwirkungen richtet sich Trastuzumab mit hoher Affinität und Spezifität gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2/neu-Rezeptors (Kaufmann und Kanz 2000). Dadurch wird das Wachstum HER-2/neu-überexprimierender Tumorzellen gehemmt (Baselga et al. 2001, McKeage and Perry 2002, Shepard et al. 1991). Der zugrundeliegende antitumorale Mechanismus konnte im Einzelnen jedoch noch nicht endgültig geklärt werden (Lohrisch and Piccart 2001, Treish et al. 2000). Aufgrund von In-vitro-Untersuchungen ist eine multifaktorielle Wirkung am wahrscheinlichsten. Durch Bindung von Trastuzumab an den HER-2/neu-Rezeptor können HER-2/neu-vermittelte Wachstumssignale nicht weitergeleitet werden. Es kommt zur Blockade des HER-2/neu-Signaltransduktionsweges und zum Stillstand des Zellzyklus in der G₁-Phase (Baselga et al. 2001, Sliwkowski et al. 1999). An weiteren Trastuzumab-bedingten Wirkungen sind bislang eine Antikörper-abhängige Aktivierung der zellulären Zytotoxizität und eine ausgeprägte Hemmung der Angiogenese belegt (Izumi et al. 2002, Shepard et al. 1991, Treish et al. 2000).

Voraussetzung für eine Therapie mit Trastuzumab ist der Nachweis einer HER-2/neu-Rezeptor-Überexpression oder einer HER-2/neu-Genamplifikation.

1.5. Methoden zum Nachweis einer HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, läßt sich der HER-2/neu-Status prinzipiell auf Gen-, mRNA- oder Proteinebene bestimmen (Harbeck et al. 1999, Lebeau und Löhrs 2001, Yamauchi et al. 2001).

Tab. 1: Methoden zur Ermittlung des HER-2/neu-Status

Bestimmung des HER-2/neu-Status anhand der	Methode
Genamplifikation	- Southern-Blot - Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) - Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
mRNA-Überexpression	- Northern-Blot - Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)
Proteinüberexpression	- Western-Blot - Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) - Immunhistochemie (IHC)

Blotting-Verfahren (Northern-, Southern- und Western-Blot) sowie auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruhende Analysen werden durch das Verhältnis von Tumorkomponente zu Stromakomponente des Untersuchungsmaterials beeinflusst. Da Mammakarzinomgewebe mehr als 50% nicht-neoplastische Zellen wie Stroma- oder Entzündungszellen enthalten können, kommt es zu mehr oder weniger starken Verdünnungseffekten (Pauletti et al. 2000, Slamon et al. 1989). Darüberhinaus benötigen Blotting-Verfahren vergleichsweise viel Untersuchungsmaterial (Slamon et al. 1989).

Durch Enzym-Immunoassays (enzyme-linked immunosorbent assay/ELISA) kann ein lösliches, 100 bis 110 kD schweres Spaltprodukt der extrazellulären Domäne des HER-2/neu-Rezeptors im Serum bestimmt werden (Leitzel et al. 1995). Solche Analysen eignen sich jedoch eher zur Verlaufskontrolle bei

Tumorprogression oder bei einer Therapie mit Trastuzumab (Rampaul et al. 2002).

Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können hingegen spezifisch eine HER-2/neu-Überexpression bzw. -Amplifikation auf Einzelzell-Basis bei erhaltener histologischer Struktur erfassen (Pauletti et al. 2000).

Zum Nachweis einer HER-2/neu-Rezeptor-Überexpression verwendet die Immunhistochemie monoklonale oder polyklonale Antikörper, die gegen das HER-2/neu-Rezeptorprotein gerichtet sind. Die dabei entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe werden über chemische Farbreaktionen dargestellt.

Die FISH-Technik arbeitet mit Fluoreszenz-markierten Sonden aus einzelsträngiger DNA, die sich mit komplementären Basensequenzen zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammenlagern (Hybridisierung). Auf diese Weise können Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder einzelne Gene selektiv dargestellt und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die FISH-Technik erlaubt eine quantitative Erfassung der HER-2/neu-Genkopien und damit den Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation.

1.6. Aktueller Stand der HER-2/neu-Diagnostik des Mammakarzinoms im Hinblick auf eine Therapie mit Trastuzumab

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt zunächst die immunhistochemische Bestimmung des HER-2/neu-Status, da auf diese Weise der HER-2/neu-Rezeptor und damit gleichzeitig die Zielstruktur von Trastuzumab nachgewiesen werden (Jacobs et al. 1999). Der HercepTest® (DAKO, Glostrup, Dänemark) ist von der Food and Drug Administration (FDA) als standardisiertes immunhistochemisches Testverfahren an Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE-) Tumorgewebe zugelassen (Lebeau et al. 2001a). Durch den HercepTest® werden Mammakarzinome mit einer schwachen bzw. starken vollständigen Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen als positiv eingestuft (HercepTest®-Score 2+ bzw. 3+). In Fällen mit einem HercepTest®-

Score von 3+ besteht die Indikation zur Trastuzumab-Therapie. Mass et al. (2000) und Lebeau et al. (2001a) stellten in 23,9% bzw. ca. 25% der Mammakarzinome mit einem HercepTest®-Score 2+ eine HER-2/neu-Genamplifikation fest. Darüberhinaus fanden Mass et al. (2001) bei Patientinnen mit einem HercepTest®-Score von 2+ und einer HER-2/neu-Genamplifikation eine ähnlich gute klinische Ansprechrate auf Trastuzumab wie bei Patientinnen mit einem HercepTest®-Score von 3+. Die alleinige Bestimmung des HER-2/neu-Status durch die Immunhistochemie reicht somit nicht aus, um alle Mammakarzinome adäquat beurteilen zu können. Daher wird als Entscheidungskriterium für bzw. gegen eine Therapie mit Trastuzumab in Fällen mit einem HercepTest®-Score von 2+ zusätzlich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt (Lebeau et al. 2001a). Bei nachgewiesener HER-2/neu-Genamplifikation in der Kontroll-FISH ist ebenfalls eine Trastuzumab-Therapie angezeigt (siehe Abbildung 4). Diese diagnostische Vorgehensweise zur Ermittlung des HER-2/neu-Status im Hinblick auf eine Therapie mit Trastuzumab wird derzeit empfohlen (Lebeau et al. 2001b).

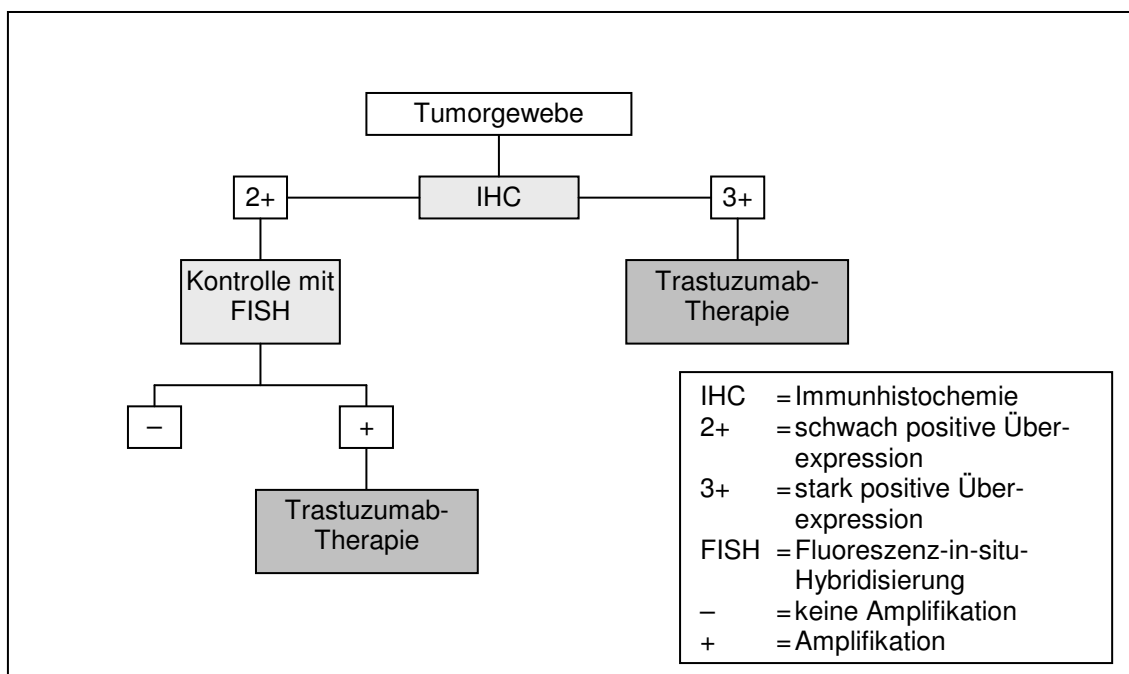


Abb. 4: Empfohlene diagnostische Vorgehensweise zur Bestimmung des HER-2/neu-Status beim Mammakarzinom

Die Immunhistochemie ist zwar im Gegensatz zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung weniger zeitaufwendig und preisgünstiger, dafür aber das Ergebnis von mehr Faktoren beeinflussbar, insbesondere von den jeweils verwendeten Antikörpern, dem Verfahren zur Signaldetektion und der subjektiven Betrachtungsweise des einzelnen Untersuchers (Jacobs et al. 1999, Kallioniemi et al. 1992, Pauletti et al. 1996, Press et al. 1994a). Dies kann an identischen Mammakarzinomen zu unterschiedlichen Resultaten in der Immunhistochemie und damit zu unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen führen.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung stehen zwei verschiedene kommerziell erhältliche und von der FDA zugelassene Testverfahren zur Verfügung (Rampaul et al. 2002). Der Inform®-HER-2/neu-Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) beinhaltet ausschließlich eine Sonde zum Nachweis des HER-2/neu-Genlokus, während mit dem doppelmarkierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) zusätzlich die Zentromerregion von Chromosom 17 dargestellt wird. Der Vorteil des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits liegt in der gleichzeitigen quantitativen Erfassung von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen. Damit besteht die Möglichkeit, zwischen einer tatsächlichen Amplifikation und einer Vermehrung von HER-2/neu-Gensignalen bei Polysomie von Chromosom 17 zu unterscheiden.

Sowohl für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als auch für die Immunhistochemie wird international routinemäßig Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe verwendet, sog. FFPE-Gewebe (Thomas et al. 2002). Jedoch muss - abgesehen von invasiven lobulären, meist kleinzelligen Mammakarzinomen - bei einer idealen Schnittdicke von 4 bis 5 µm und Tumorzellkerngrößen von durchschnittlich 10 bis 15 µm damit gerechnet werden, dass zumindest teilweise nur Kernanschnitte ausgewertet werden können (Pauletti et al. 1996). Vor allem bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist dies von Nachteil, da mit einem quantitativen Verlust von Gensignalen gerechnet werden muss. Im Gegensatz zur Paraffinhistologie ermöglicht zytologisches Material

eine Beurteilung vollständiger und meist isoliert liegender Tumorzellkerne. Dadurch können eine exakte quantitative Signalerfassung und eine detaillierte Befunderhebung vorgenommen werden.

In einem aufwendigen Verfahren extrahierten Lebeau et al. (2001a) Tumorzellkerne aus 25 µm dicken Paraffinschnitten für FISH-Analysen an Mammakarzinomen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit. Die Übereinstimmung zu FISH-Untersuchungen an konventionellen Paraffinschnitten betrug dabei 96%. Sauter et al. (1993) führten sowohl an dissoziierten Zellkernen als auch an Tumorabklatschpräparaten von Blasenkarzinomen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen durch. Für FISH-Untersuchungen an Mammakarzinomen verwendeten Kallioniemi et al. (1992) durch Feinnadelpunktion gewonnenes Aspirationsmaterial und Tumorabklatschpräparate. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Korrelation zu immunhistochemischen Untersuchungen. Dabei erwies sich die Herstellung von Tumorabklatschpräparaten als schnelles und einfaches Verfahren: Die frische Schnittfläche von intraoperativ oder durch unterschiedliche Biopsiemethoden gewonnenem Tumorgewebe wird auf Objektträger aufgedrückt, verschiedenen Fixierungsarten unterzogen und der weiteren Diagnostik zugänglich gemacht.

1.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten

Wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, ist die Bestimmung des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten prinzipiell möglich. Im Gegensatz zur Paraffinhistologie kann dabei eine schnittunabhängige Signaldetektion erwartet werden. Das geeignetere Testverfahren scheint der doppelmarkierte PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit zu sein, da er zwischen einer HER-2/neu-Genamplifikation und einer Polysomie von Chromosom 17 differenzieren kann.

Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Dissertation Tumorabklatschpräparate von 150 Mammakarzinomen hergestellt und an diesen FISH-Analysen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit durchgeführt. Dafür musste das an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE)-Präparaten etablierte Protokoll des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits an Tumorabklatschpräparate adaptiert werden.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde von diesen Mammakarzinomfällen ein Gewebemultiblock (Tissue microarray/TMA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen angefertigt. Die TMA-Technik wurde erstmals im Jahr 1986 von Battifora vorgestellt und 1998 von Kononen und Mitarbeitern perfektioniert (Battifora 1986, Kononen et al. 1998). Nach diesem Prinzip wurden 256 Stanzzylinder mit Hilfe einer Gewebestanze aus herkömmlichen Paraffinblöcken, den Donorblöcken, entnommen und in vorgebohrte Löcher eines sogenannten Akzeptorblocks eingebracht. An einem einzigen Schnitt dieses Gewebemultiblocks wurde eine Doppelfärbung aus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz durchgeführt.

Für einen zusätzlichen Vergleich standen in 24 der insgesamt 150 Mammakarzinomfälle routinemäßig erstellte FISH-Untersuchungen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an konventionellen Paraffinschnitten des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen zur Verfügung.

2. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation war es, zur Klärung folgender Fragen beizutragen:

- Ist eine Anwendung der FISH-Methode mit dem modifizierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit bei Tumorabklatschpräparaten möglich?
 - Läßt sich mit diesem Verfahren zuverlässig eine HER-2/neu-Genamplifikation nachweisen?
 - Gibt es übereinstimmende Ergebnisse zwischen Tumorabklatschpräparaten, Gewebemultiblockschnitt und herkömmlichen Paraffinschnitten?
 - Wie sind die erzielten Resultate zu interpretieren?
 - Welchen Stellenwert besitzt die FISH-Analyse an Tumorabklatschpräparaten in der HER-2/neu-Diagnostik?
-

3. Material und Methode

3.1. Material

3.1.1. Gewebeproben und Tumorabklatschpräparate

Insgesamt 150 Mammakarzinomfälle mit histologisch gesicherter Diagnose wurden in diese Studie aufgenommen. Der HER-2/neu-Status war in allen Fällen durch eine immunhistochemische Untersuchung des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen ermittelt und teilweise durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ergänzt worden.

Im Einzelnen handelte es sich um 89 invasive duktale, 28 invasive lobuläre, 20 invasive duktulo-lobuläre, 5 invasive medulläre, 3 invasive muzinöse, 3 gemischt invasiv-duktales und invasiv-muzinöse sowie 2 klarzellige Mammakarzinome. Von diesen Mammakarzinomen wiesen insgesamt 45 eine Carcinoma-in-situ-Komponente auf (duktales Carcinoma in situ/DCIS, lobuläres Carcinoma in situ/LCIS).

Die untersuchten Mammakarzinomgewebe wurden an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen im Zeitraum von 1999 bis 2002 entweder zu diagnostischen Zwecken mittels Stanzbiopsie und Probeexzision oder im Rahmen von brusterhaltender Therapie bzw. modifiziert radikaler Mastektomie entnommen. Unmittelbar nach Probengewinnung oder operativer Entfernung fand die Herstellung der Tumorabklatschpräparate im histologischen Labor des Institutes für Pathologie an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen statt. Dazu wurde das native Mammakarzinomgewebe angeschnitten und mit der frischen Schnittfläche 5 bis 10 mal leicht auf Superfrost®-Adhäsiv Objektträger gedrückt. Auf diese Weise wurden von jedem Mammakarzinom 4 bis 6 Abklatschpräparate angefertigt. Anschließend erfolgten Fixierung mittels Merckofix®-Fixationsspray, Aufbewahrung in Objektträgerboxen und Lagerung bei –20°C im Dunkeln.

Eine Genehmigung von Seiten der Ethikkommission lag vor (Annahmebescheinigung als Doktorandin vom 20.08.2002).

3.1.2. Materialliste

PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA)	
LSI HER-2/neu SpectrumOrange (low copy number E. coli Vector) / CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde (E. coli Plasmid) (LSI = locus specific identifier, CEP = chromosome enumeration DNA probe)	<ul style="list-style-type: none"> - 190 kb große, mit SpectrumOrange direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für den Genlocus HER-2/neu (17q11.2-q12) - mit 5.4 kb SpectrumGreen direktmarkierte spezifische Fluoreszenz-DNA-Sonde für die alpha-Satellit-DNA-Sequenz im Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) - blockierende DNA - vorgemischt und vordenaturiert in Hybridisierungspuffer (formamidhaltig)
DAPI Gegenfärbung	<ul style="list-style-type: none"> - 1000 ng/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindol - 1,4-Phenyldiamin Dihydrochlorid - Glyzerin - Puffer
NP-40	- Nonylphenyl-polyethylenglykol-40
20 x SSC Salz (SSC = sodium saline citrate)	<ul style="list-style-type: none"> - 3M Natriumchlorid - 0,3M Natriumcitrat - pH 5,3

Labormaterial und Labortechnik	
Deckgläser (22 x 22 mm, 24 x 32 mm)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Diamantschreiber	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbeküvetten (mit Färbeeinsatz und Falzdeckel)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Färbezylinder (rechteckig, mit Überfalldeckel)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Handschuhe (safeskin, satin plus)	Kimberly-Clark, Roswell, USA
HyBrite™ Denaturierungs- und Hybridisierungssystem	Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA
Laborthermometer (geeicht)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laborwecker	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Messpipetten (20 ml)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messzylinder (250 ml, 500 ml)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikroliterpipetten (10 µl, 500 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge (Biofuge pico)	Haereus, Osterode, Deutschland
Objektträgerbox (mit Deckel)	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Peel-a-way slide grip	Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA
Pinzette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (steril)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Superfrost®-Adhäsiv Objektträger (25 x 75 mm, vorgereinigt)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Vortex-Mixer	cenco instrumenten MIJ.N.V., Breda, Niederlande

Lösungen und Reagenzien	
Ampuwa® (Aqua dest.)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ethanol 99,9%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Foto-Klebstoff	Herma, Filderstadt, Deutschland
Immersionsöl für Fluoreszenzmikroskopie (mit geringer Autofluoreszenz)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Merckofix®-Fixationsspray	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nagellack	Lady Manhattan Cosmetics GmbH, Stuttgart, Deutschland

Optische Geräte	
Fluoreszenzmikroskop BX 60 mit - 10er Objektiv - 63er Ölimmersionsobjektiv - 100er Ölimmersionsobjektiv	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop-Filterhalter BX	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop-Filtersätze - Einfachbandpass-Filter DAPI - Einfachbandpass-Filter Green - Einfachbandpass-Filter Orange	Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA
Kamera (Typ FK 7512/ Q)	Pierer, Düsseldorf, Deutschland
Mercury Burner (100 Watt Quecksilberdampf-Lampe, Typ USH-I 02 D)	Ushio, Inc., Tokyo, Japan
Mercury Burner Power Supply Unit (Typ U-RFL-T)	Olympus, Hamburg, Deutschland

Hard- und Software	
Power Macintosh G3	Apple Computer, Inc., Cork, Irland
Quips® PathVysion (Smart Capture VP, Version 1.4)	Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA

3.2. Methode

3.2.1. Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Analyse ist ein molekulargenetisches Verfahren zum gezielten Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen von DNA bzw. RNA und findet in situ statt, d.h. direkt an Metaphase-Chromosomen, Interphase-Zellkernen, Zellen oder Gewebeschnitten auf einem Objektträger. Dabei kommen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden zum Einsatz, die eine komplementäre Basensequenz zur gesuchten DNA aufweisen (siehe Abbildung 5).

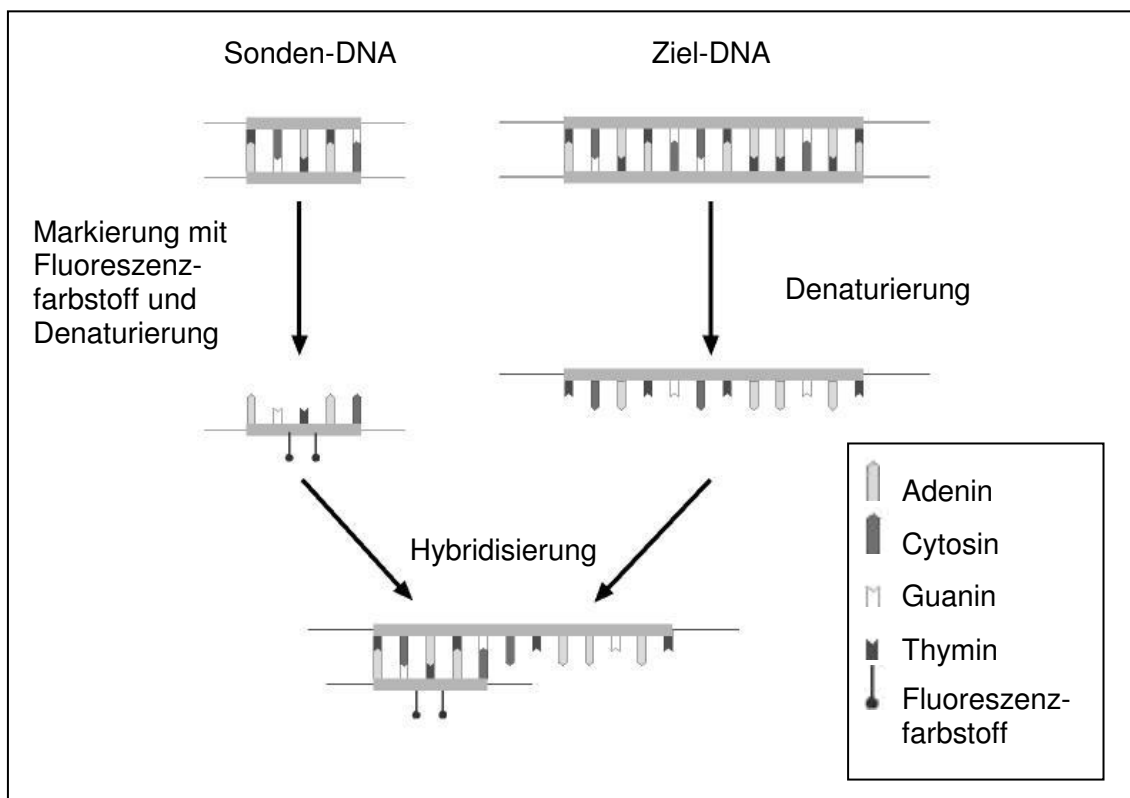


Abb. 5: Schematische Darstellung der FISH-Technik

(modifiziert nach Aldinger K (1993), Quantitative Analyse fluoreszenzgefärbter Chromosomen und Zellkerne unter Verwendung einer CCD-Farbkamera, Diplomarbeit, Institut für angewandte Physik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg)

Durch thermische und/oder enzymatische Behandlung werden die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Basenpaaren Adenin und Thymin einerseits und Cytosin und Guanin andererseits gelöst. Somit wird die nachzuweisende Nukleotidsequenz frei zugänglich. An diese Denaturierung zu DNA-Einzelsträngen schließt sich die Hybridisierung an, d.h. die Zusammenlagerung von Ziel-DNA und Fluoreszenzfarbstoff-markierter Sonde zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt, der Hybrid-DNA. Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder einzelne Gene können so identifiziert werden. Darüberhinaus lassen sich numerische (Aneuploidie) und strukturelle (Deletionen, Translokationen) Chromosomenaberrationen oder Amplifikationen von Genen wie zum Beispiel Onkogenen detektieren. Bei gleichzeitiger Verwendung von mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden ist eine Mehrfarben-Analyse möglich.

Die Darstellung der Fluoreszenzfarbstoffe und damit der gesuchten Nukleinsäuresequenz gelingt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (siehe Abbildung 6, Seite 23). Als Lichtquelle dient eine Exzitationslampe wie beispielsweise eine Quecksilberdampflampe, die Anregungsstrahlung in ausreichender Intensität und bestimmter Wellenlänge liefert. Durch diese energiereichen, kurzwelligen Strahlen werden die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von energieärmer, langwelliger Strahlung (Fluoreszenz) angeregt. Dabei filtert ein sogenannter Erreger- oder Exzitationsfilter aus dem Lampenlicht den Wellenlängenbereich heraus, bei dem der Farbstoff optimal zur Fluoreszenz angeregt wird. Ein sogenannter Sperr- oder Emissionsfilter vor dem Okular läßt nur Fluoreszenzlicht eines bestimmten Wellenlängenbereichs hindurch. Die fluoreszenzmarkierten, hybridisierten Sonden imponieren als scharf begrenzte, je nach Sondenlänge unterschiedlich große, im Vergleich zur Umgebung lichthelle Signale. Durch Verwendung von Einfach- oder Mehrfachbandpassfiltern können Fluoreszenzen einzeln oder gemeinsam erfasst werden.

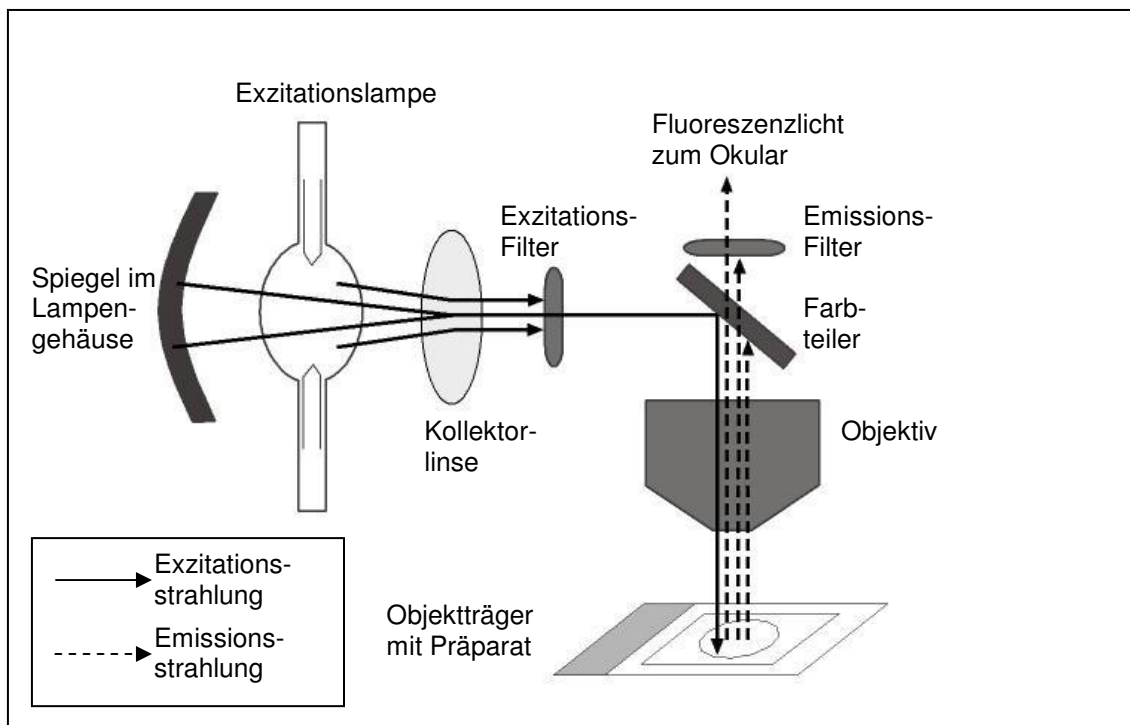


Abb. 6: Aufbau und Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops (Schema)
(modifiziert nach Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA, Produktkatalog (1999-2000))

Mit diesem Prinzip arbeitet der doppelmarkierte PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). Eine orange fluoreszierende Sonde stellt den HER-2/neu-Genlocus dar (LSI HER-2/neu SpectrumOrange DNA-Sonde), eine grün fluoreszierende Sonde bindet an die Zentromerregion von Chromosom 17 (CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde). Es werden also sowohl das HER-2/neu-Gen als auch das Chromosom 17 identifiziert und quantifiziert. Durch diese zusätzliche Kontrolle der Chromosom-17-Anzahl wird verhindert, dass eine Abweichung vom diploiden Chromosomensatz im Sinne einer Aneuploidie fälschlicherweise als Genamplifikation interpretiert wird.

In Abbildung 7 (siehe Seite 24) sind schematisch die Kartierung von Chromosom 17 und die HER-2/neu-Gensonde (17q11.2-q12) sowie die CEP

17-Sonde für den Zentromerbereich von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) dargestellt.

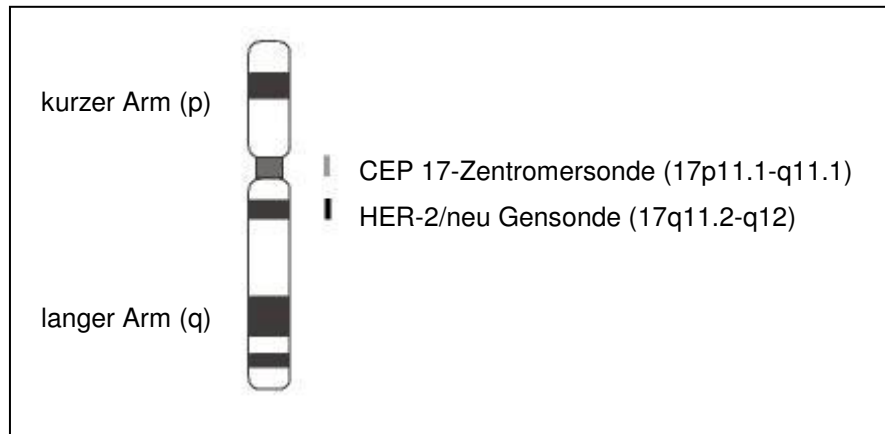


Abb. 7: Kartierung von Chromosom 17 mit HER-2/neu-Gensonde und CEP 17-Zentromersonde (schematisch)
(modifiziert nach Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA, Produktkatalog (1999-2000))

Herstellerseits ist der PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit bereits vordenaturiert, wodurch ein Arbeitsschritt bei der Durchführung der FISH-Analyse eingespart wird. Um eine möglichst effektive Hybridisierung zu erreichen, liegt die insgesamt 190.000 Basenpaare (190 kb) umfassende LSI HER-2/neu SpectrumOrange DNA-Sonde in etwa 500 Basenpaar-langen Fragmenten vor. Zur Gegenfärbung und Darstellung der Zellkerne dient ein blau fluoreszierender, interkalierender Farbstoff (DAPI), der sich zwischen die Basenpaare schiebt.

Der PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit ist von der FDA zur Bestimmung der HER-2/neu-Genamplifikation beim Mammakarzinom zugelassen.

3.2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten

Eine komplette FISH-Analyse unter Verwendung des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits umfasste zwei Arbeitstage. Am ersten Tag wurden die Tumorabklatschpräparate vor Denaturierung und Hybridisierung einem Waschvorgang (Vorbehandlung) und einer anschließenden Dehydratation unterzogen. Ein erneuter Waschvorgang (Nachbehandlung/Stringenzwaschung), Gegenfärbung der Zellkerne und fluoreszenzmikroskopische Auswertung beendeten am darauffolgenden Tag den Arbeitsprozess. Dabei wurde in Absprache mit dem Hersteller die für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Präparate etablierte Methode vereinfacht und in dieser Modifikation bei Tumorabklatschpräparaten angewendet.

Vorbereitung

Die erforderlichen Puffer und Lösungen wurden für jede Kit-Charge frisch angesetzt und die jeweils benötigten Teilmengen nach Gebrauch verworfen:

- Herstellung von 20 x SSC-Reagenzlösung (Grundlösung):
66 g 20 x SSC wurden in 250 ml Aqua dest. unter kräftigem Schütteln gelöst.
 - Herstellung der 2 x SSC + 0,1% NP-40-Waschlösung für Tag 1 (zur Vorbehandlung):
50 ml 20 x SSC-Reagenzlösung wurden mit 450 ml Aqua dest. verdünnt und anschließend 500 µl NP-40 zugegeben.
 - Herstellung der 0,5 x SSC + 0,1% NP-40-Waschlösung für Tag 2 (zur Nachbehandlung/Stringenzwaschung):
12,5 ml 20 x SSC-Reagenzlösung wurden mit 487,5 ml Aqua dest. und 500 µl NP-40 vermischt.
-

- Herstellung der Alkoholverdünnungsreihe für Tag 1 (zur Dehydratation):
75 ml Aqua dest. und 175 ml 99,9% Ethanol ergaben 70% iges Ethanol;
37,5 ml Aqua dest. und 212,5 ml 99,9% Ethanol ergaben 85% iges Ethanol.

Durchführung Tag 1

Vorbehandlung – Denaturierung – Hybridisierung

Pro FISH-Analyse wurden Tumorabklatschpräparate von 5 verschiedenen Patientinnen gleichzeitig verarbeitet und dazu von –20 °C auf Raumtemperatur erwärmt. Für eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung geeignete zellreiche Areale wurden durch eine Diamantstift-Markierung auf der Objektträgerunterseite gekennzeichnet. Eine Vorbehandlung in 2 x SSC + 0,1% NP-40-Waschlösung bei 37 °C im Wasserbad für 15 bis 30 min wurde der Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe mit 70%, 85% und 99,9% Ethanol für jeweils 2 bis 5 min vorangestellt. Nach Abtupfen von Kanten und Unterseiten der Objektträger mit einem Papiertuch trockneten die Präparate bei 45 °C auf der Wärmplatte des HyBrite®-Systems. Zeitgleich wurde die LSI HER-2/neu SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde auf Raumtemperatur erwärmt und mit einem Vortex-Mixer durchmischt. Jeweils 10 µl des Sondengemischs wurden auf Deckgläser der Größe 22 x 22 mm pipettiert. Diese Deckgläser wurden auf die Objektträger aufgebracht und, nachdem die Sondenlösung durch vorsichtiges Drücken gleichmäßig verteilt war, mit Fotoklebstoff luftblasenfrei versiegelt. Im HyBrite®-System erfolgte die Denaturierung von Sonden- und Gewebematerial simultan bei 73 °C für 5 min. Sowohl Denaturierung als auch anschließende Hybridisierung bei 37 °C für 14-18 h über Nacht liefen als programmierte Arbeitsprozesse automatisch ab.

Durchführung Tag 2

Nachbehandlung/Stringenzwaschung – Zellkern-Gegenfärbung – Auswertung

Um überschüssiges und unspezifisch gebundenes Sondenmaterial zu entfernen und störende Eigenfluoreszenzen zu vermeiden, war ein weiterer Waschvorgang erforderlich (Nachbehandlung/Stringenzwaschung).

Nach Entfernung des Foto-Klebstoffs wurden die Präparate zum Ablösen der Deckgläser für 5 min in 2 x SSC + 0,1% NP-40-Pufferlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Präparate für jeweils 2 min in 0,5 x SSC + 0,1% NP-40-Waschlösung bei $72\pm 1^\circ\text{C}$ im Wasserbad und in 2 x SSC + 0,1% NP-40-Pufferlösung bei Raumtemperatur gewaschen und im Dunkeln luftgetrocknet werden. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden je 10 μl DAPI (1000 ng/ml 4,6-Diamidino-2-phenylindol in 1,4-Phenyldiamin Dihydrochlorid, Glycerin und Puffer) auf 24 x 32 mm-große Deckgläser pipettiert, diese auf die Objektträger gedrückt und mit Nagellack abgedichtet. Dabei verhinderte der Zusatz von 1,4-Phenyldiamin Dihydrochlorid ein schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe.

Die Präparate konnten entweder sofort fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet oder vorerst bei -20°C im Dunkeln gelagert werden.

Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde an einem Olympus Fluoreszenzmikroskop BX 60 mit einer 100 Watt Quecksilberdampf-Lampe und den drei Einfachbandpass-Filtern DAPI, Green und Orange durchgeführt.

Tiefgefrorene Präparate mussten zur Auszählung zunächst Zimmertemperatur erlangen. Nach einer ersten Orientierung bei 10facher Vergrößerung wurden die Präparate mit dem 100er-Ölimmersionsobjektiv und den verschiedenen Einfachbandpass-Filtern auf ihre Qualität hin überprüft. Zum einen wurden Intensität und Form der Sondensignale beurteilt, zum anderen wurde der

Hintergrund nach fluoreszierenden Partikeln abgesucht. Eine Auswertung erfolgte bei eindeutig zu erkennenden, kompakt-ovalen oder diffus-ovalen Sondersignalen und bei fehlendem bzw. nicht störendem Hintergrund. Andernfalls wurden die FISH-Analysen wiederholt.

Pro Präparat wurden 60 Tumorzellen ausgezählt, wobei im linken oberen Bereich des selektierten Areals begonnen und der Objektträger von links nach rechts mäanderförmig abgefahren wurde. Zunächst mussten anhand zytologisch relevanter Malignitätskriterien Tumorzellen identifiziert werden. Dazu zählen insbesondere Kerngröße sowie Variabilität in Kerngröße (Anisokaryose) und Kernform (Polymorphie bzw. Pleomorphie):

- Die Kerne von Tumorzellen sind - abgesehen von invasiven lobulären Mammakarzinomen - meist um ein Mehrfaches größer als die Kerne von normalen Duktusepithelien, wobei Kerndurchmesser von 12-40 µm erreicht werden. Eine Kontrolle ist durch den Größenvergleich mit den meist vorhandenen Erythrozyten (ca. 7,5 µm) möglich.
- Im Gegensatz zu nichtneoplastischem Gewebe ist die Anisokaryose in Tumorzellpopulationen deutlich ausgeprägt.
- Durch Buchtungen, Kerbungen und Ausstülpungen der Kernmembran kommt es zur Entrundung der Tumorzellkerne. Dabei kann die Kernform von Tumorzelle zu Tumorzelle wechseln, so dass kein Zellkern dem anderen gleicht.

Für eine korrekte Auswertung der 60 Tumorzellkerne fanden folgende Kriterien Beachtung:

- Die Tumorzellkerne mussten deutlich erkennbare Begrenzungen aufweisen und frei von störender gegenseitiger Überlappung sein (siehe Abbildung 8, Seite 29).
 - Ausgewertet wurden nur Tumorzellkerne mit mindestens einem oder mehreren Sondersignalen von jeder Farbe.
 - Die Signale mussten innerhalb der Tumorzellkerne lokalisiert und von ausreichender Intensität sein.
 - Durch Fokussieren auf unterschiedlichen Schärfeebenen wurden alle im Tumorzellkern vorhandenen Signale erfasst.
-

- Ein gesplittetes Signal lag vor, wenn der Abstand zweier Signale gleicher Größe, Farbe und Stärke maximal dem Durchmesser eines dieser Signale entsprach. In einem solchen Fall wurden die beiden Einzelsignale als ein Signal betrachtet und gewertet (siehe Abbildung 8).

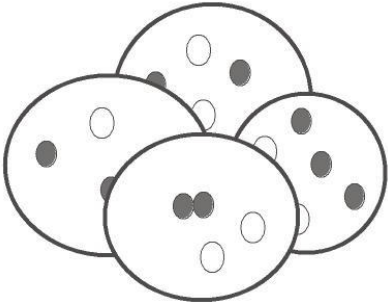
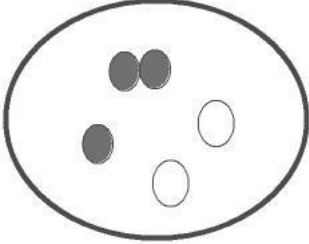
<p><u>Überlappung von Tumorzellkernen</u></p> <p>Nicht alle Bereiche der Zellkerne sind einsehbar und einige Signale befinden sich im überlappenden Bereich. Diese Tumorzellkerne wurden nicht gewertet.</p>	
<p><u>Gesplittetes Signal</u></p> <p>Der Abstand zweier orange fluoreszierender Signale gleicher Größe beträgt weniger als der Durchmesser eines dieser Signale, so dass die beiden Einzelsignale als ein gesplittetes und somit als ein Signal gezählt wurden.</p>	

Abb. 8: Beispiele und Richtlinien zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit

- orange fluoreszierendes HER-2/neu-Gensignal
- grün fluoreszierendes CEP 17-Chromosomsignal

(modifiziert nach Abbott/ Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA, Protokoll des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits (2001))

Dokumentation

Den Vorgaben der Firma Abbott/Vysis entsprechend wurden die 60 gezählten Tumorzellen nach HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen aufgeschlüsselt und tabellarisch festgehalten (siehe Tabelle 3, Seite 47). Darüberhinaus wurde über das genaue Verhältnis von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen jeder einzelnen Tumorzelle Protokoll geführt und dieses als Zahlenpaar in eine weitere Tabelle eingetragen (siehe Tabelle 4, Seite 47).

Um eine HER-2/neu-Genamplifikation nachzuweisen, wurde für jedes Präparat der Quotient aus der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale (ungerundet) und der durchschnittlichen Anzahl der CEP 17-Chromosomensignale (ungerundet) bei 60 ausgezählten Tumorzellkernen gebildet (Vysis-Ratio). Die ermittelten Ergebnisse wurden auf eine Nachkommastelle gerundet. Eine Genamplifikation lag bei einer Ratio größer/gleich 2 vor. Ergebnisse zwischen 1,8 und 2,2 waren jedoch als grenzwertig zu betrachten und entsprechend zu interpretieren.

Eine zusätzliche Differenzierung wurde anhand der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern vorgenommen (gerundet auf eine Nachkommastelle). Auf dieser Grundlage nimmt das Protokoll des Inform®-HER-2/neu-Kits (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) eine Einteilung in nicht amplifizierte und amplifizierte Fälle vor. Danach handelt es sich bei einem Wert größer 4 um eine Amplifikation. Der zweite Expertenworkshop zu „Neuen Entwicklungen bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms“ von 1999 hingegen spricht erst ab einem Wert größer 10 von einer Amplifikation (Kaufmann und Kanz 2000). Im Gegensatz zur Vysis-Ratio bleibt dabei die durchschnittliche Anzahl der CEP 17-Chromosomensignale pro Tumorzellkern unberücksichtigt. In Anlehnung an diese beiden Bewertungsmaßstäbe wurden in der vorliegenden Dissertation nicht amplifizierte (keine Amplifikation/NA), niedrig amplifizierte (Low-Level-Amplifikation/LLA) und hoch amplifizierte (High-Level-Amplifikation/HLA) Fälle unterschieden. Ergebnisse größer 4 und kleiner/gleich 10 entsprachen einer

Low-Level-Amplifikation, Werte darüber einer High-Level-Amplifikation. Dieser kombinierte Bewertungsmaßstab wird im Folgenden als Klassifizierung nach Ventana bezeichnet (Kurzform: nach Ventana).

Für jeden Fall wurden die häufigste Signalkombination bzw. häufigsten Signalkombinationen sowie die minimalen und maximalen Werte der HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale ermittelt und festgehalten. Darüberhinaus wurden Zellzahl, Vorhandensein von Hintergrund und seine Beschaffenheit sowie Intensität und Qualität der Signale beurteilt.

Ergänzend erfolgte eine fotografische Dokumentation. Unter Verwendung der Einfachbandpass-Filter DAPI, Orange und Green und des Programms Quips® PathVysion wurden zunächst Einzelaufnahmen von Tumorzellkernen, HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen erstellt und durch additive Farbmischung zu einem Foto aggregiert. Auf diese Weise entstand für jedes Präparat eine Serie von in der Regel 4 bis 10 Aufnahmen verschiedener Tumorzellkerne. Anzahl und jeweilige Nummer der Aufnahmen sowie die fotografierten Tumorzellkerne mit zugehöriger Kombination aus HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen wurden auf dem entsprechenden Protokoll vermerkt.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen und fluoreszenzmikroskopische Auswertungen wurden dabei zum Teil mit Frau cand. med. Sina Herzog in gemeinschaftlicher Arbeit durchgeführt.

3.2.3. Prinzip des Gewebemultiblocks

(Synonyme: Tissue microarray/TMA, Gewebemikroarray, Multi-Gewebe-Array, Multi-Gewebeblock, Gewebechip)

Bei Gewebemultiblocks handelt es sich um Paraffinblöcke, die bis zu 1000 verschiedene Paraffingewebszylinder enthalten. Zur Erstellung eines Gewebemultiblocks werden mit Hilfe einer Gewebestanze Stanzzylinder aus herkömmlichen Paraffinblöcken, den sogenannten Donorblöcken, entnommen und diese in vorgebohrte Löcher eines sogenannten Akzeptorblocks eingeführt.

An einem Schnitt des Gewebemultiblocks können bis zu 1000 unterschiedliche Gewebeproben gleichzeitig untersucht werden. Auf diese Weise ist eine deutliche Geschwindigkeitssteigerung in der Beurteilung möglich.

3.2.4. Zytokeratin-8 und Prinzip der Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz

Charakteristische Zytoplasmabestandteile aller eukaryonten Zellen sind Mikrofilamente, intermediäre Filamente und Mikrotubuli. Es handelt sich dabei um Strukturproteine unterschiedlichen Durchmessers, die durch Aneinanderlagerung zunächst dünne Proteinfasern (Filamente) bilden. Über weitere Polymerisationsschritte entstehen die drei oben genannten zytoplasmatischen Filamentsysteme, die sich schließlich zu einem feinen, das Zytoplasma strukturierenden Netzwerk zusammenfügen, dem Zytoskelett. Das Zytoskelett bestimmt Form und Festigkeit der Zelle und ist für Bewegungs- und intrazelluläre Transportvorgänge von Bedeutung.

Die stabilsten Komponenten des Zytoskeletts sind die intermediären Filamente, die daher in Zellen mit mechanischer Beanspruchung vorherrschen. Dabei erstrecken sich die intermediären Filamente vom Zellkern, mit dem sie verknüpft sind, durch das Zytoplasma bis in die Zellmembran. Dort binden sie an die Desmosomen und bilden über die Zellen hinweg ein Gerüstwerk zytoplasmatischer Filamente.

Die Zytokeratine als eine Klasse der intermediären Filamente zeichnen sich durch ihre gewebsspezifische Verteilung aus. So ist zum Beispiel Zytokeratin-8 spezifisch für Epithelzellen. Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen kann Zytokeratin-8 in der Plasmamembran und im Zytoplasma von Epithel- und Tumorzellen nachgewiesen und auf diese Weise die Identifikation und Abgrenzung des Tumors vom umgebenden Gewebe erleichtert werden. Dies ist vor allem bei lobulären Mammakarzinomen mit kleinen Tumorzellen und Mammakarzinomen, die entweder eine ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen oder einen geringen Zellgehalt aufweisen, von Nutzen.

Die Immunfluoreszenz ist eine immunzytochemische Untersuchungsmethode zum Nachweis von bestimmten, als Antigen fungierenden Proteinen mittels spezifischer Antikörper, die über primäre oder sekundäre Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff identifiziert werden können. Analog zur physiologischen Funktion von Antikörpern binden sogenannte Primärantikörper an membranäre, zytoplasmatische oder nukleäre Proteine bzw. Antigene. Der dabei gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird anschließend über verschiedene Nachweismethoden sichtbar gemacht.

Je nach Herstellungsmodus lassen sich monoklonale und polyklonale Primärantikörper voneinander unterscheiden:

Die Hybridomtechnik ist eine Methode zur Produktion monoklonaler Antikörper und beruht auf der Immortalisierung genetisch identischer Plasmazellen durch Fusionierung mit Myelomzellen. Die dabei entstehenden Hybridome besitzen sowohl die Eigenschaft, Antikörper mit genau definierter Spezifität und Affinität für ein bestimmtes Epitop eines Proteins zu produzieren, als auch in Kulturen weiterzuleben und sich zu vermehren.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wird zunächst eine Immunisierung von Tieren wie beispielsweise Schaf oder Kaninchen mit dem gesuchten Protein durchgeführt. Im Rahmen der physiologischen Abwehrreaktion kommt es zur Aktivierung mehrerer Plasmazellklone, die Antikörper gegen verschiedene Epitope des gesuchten Proteins sezernieren. Diese polyklonalen Antikörper werden anschließend aus dem tierischen Serum extrahiert. Bei diesem Prozess können Verunreinigungen in Form von Antikörpern zurückbleiben, die gegen andere Proteine gerichtet sind. Sie sind als Ursache von unspezifischen Signalen anzusehen und können bei Analysen zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Die routinemäßig verwendete Fixierung von Geweben mit 4,5% Formaldehyd bewirkt über die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen Proteinen und Formaldehyd eine Denaturierung und sterische Konformationsänderung der Proteine, so dass die von den Antikörpern zu erkennenden Epitope verdeckt werden können. Vor Einsatz der Primärantikörper ist daher eine sogenannte Antigendemaskierung notwendig. Durch Zufuhr thermischer Energie in einem

geeigneten Pufferbad werden die Proteine renaturiert und auf diese Weise die Epitope freigelegt.

Um den an das gesuchte Protein gebundenen Primärantikörper anschließend sichtbar zu machen, gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Verfahren. Bei der direkten Methode werden die Primärantikörper vor Hybridisierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, während bei der indirekten oder Sandwich-Methode ein fluoreszierender Sekundärantikörper zum Einsatz kommt. Dieser bindet als Anti-Immunglobulin-Antikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers und bewirkt so eine deutliche Steigerung der Sensitivität (siehe Abbildung 9).

Der Fluoreszenzfarbstoff kann in einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und über einen speziellen Emissionsfilter selektiv dargestellt werden.

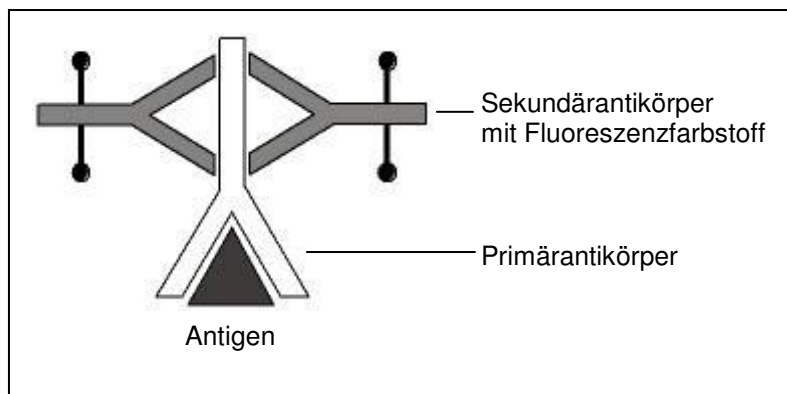


Abb. 9: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

(modifiziert nach Junqueira LC und Carneiro J (1996), Histologie, 4. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York)

3.2.5. Doppelmarkierung aus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz am Gewebemultiblockschnitt

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen erfolgte die Anfertigung eines Gewebemultiblocks bestehend aus den 150 Mammakarzinomfällen, die bereits anhand von Tumorabklatschpräparaten auf eine HER-2/neu-Genamplifikation untersucht worden waren. An einem Schnitt des Gewebemultiblocks wurden sowohl eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation als auch eine Immunfluoreszenz zur Darstellung von Zytokeratin-8 vorgenommen, so dass eine Doppelfärbung vorlag. Zum Nachweis von Zytokeratin-8 wurde als Primärantikörper monoklonales Anti-Zytokeratin-8 eingesetzt (Klon Ks 8.7, Verdünnung 1:100, Cat. No. 61038, Progen, Heidelberg) und als Sekundärantikörper polyklonales Anti-Maus-Ig-Rhodamin-F(ab')₂-Fragment verwendet (affinitätsgereinigtes Schaf-IgG, F(ab')₂-Fragment gegen Maus-Ig, konjugiert mit 5(6)-Carboxy-rhodamin-101-N-hydroxysuccinimidester (RHODOS) Lyophilisat, stabilisiert, Verdünnung 1:10, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland).

Vorbereitung

Herstellung der Gewebestanze – Herstellung des Akzeptorblocks – Auswahl der Donorblöcke

Herstellung der Gewebestanze

Eine gebrauchte handelsübliche Gewebestanze (ASAP™ Channel Cut Biopsy System, Mediatech, Boston Scientific Int., Paris, Frankreich) wurde zunächst mit einem Bohrschleifer (IB/E Industriebahrschleifer, Proxxon GmbH, Niersbach, Deutschland) aufgeschnitten. Nach Entnahme von Stanznadel und Mandrin wurden beide mit einer Trennscheibe gekürzt. Außerdem wurde die Stanznadel mit einem Innendurchmesser von 1 mm neu angeschliffen.

Herstellung des Akzeptorblocks

Unter Einsatz einer CNC (computer numerical control)-Bohrmaschine (Maho MH 400, Deckel Maho Gildemeister GmbH, Bielefeld, Deutschland) wurde die Bodenplatte eines in der Routinediagnostik üblichen Ausgießmodells aus Stahl mit 325 Bohrlöchern versehen, die in 25 vertikalen Spalten und 13 horizontalen Zeilen angeordnet waren und einen Durchmesser von 1 mm aufwiesen. Der Abstand zweier benachbarter Bohrlöcher betrug dabei 0,3 mm. Um das spätere Ausbrechen von Rändern bzw. Ecken des Gewebemultiblocks zu verhindern, waren die Bohrlöcher von Rändern und Ecken ca. 0,5 cm entfernt.

Der Ausgießmodell wurde unter Vermeidung von Luftblasen mit routinemäßig verwendetem Paraffin (Paraplast Plus, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland) gefüllt, das zuvor bei 60°C geschmolzen worden war. Nach Erstarren des Paraffins wurden mit dem Bohrschleifer durch die vorgegebenen Löcher in der Bodenplatte die für die Gewebestanzylinder erforderlichen Löcher (Durchmesser 1 mm) ins Paraffin gebohrt.

Durch Abkühlen des Ausgießmodells für ca. 10 min bei 4°C im Kühlschrank zog sich das Paraffin zusammen, so dass der fertige Akzeptorblock vom Metallmodell gelöst werden konnte.

Auswahl der Donorblöcke

Von den erwähnten 150 Mammakarzinomfällen wurden die als Donorblöcke fungierenden Paraffinblöcke aus dem Blockarchiv des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen herausgesucht. Anhand der pathologischen Befundtexte konnte für jeden Fall derjenige Paraffinblock ermittelt werden, der möglichst viel Tumorgewebe enthielt. Zusätzlich wurden die korrespondierenden Hämalaun-Eosin-(HE)-Schnitte in einem Kollektiv zusammengestellt.

Durchführung Tag 1

Füllen des Akzeptorblocks mit Gewebestanzylindern der Donorblöcke – Anlegen einer Access-Datei

Die Bestückung des Gewebemultiblocks bestand im Wesentlichen aus drei Schritten, die sich laufend wiederholten (siehe Abbildung 10):

1. Entnahme des Gewebestanzylinders aus dem Donorblock
2. Einbringen des Gewebestanzylinders in das vorgefertigte Loch im Akzeptorblock
3. Erfassen von Position, Eingangsnummer und histologischem Befund jeder Stanze in einer Access-Tabelle

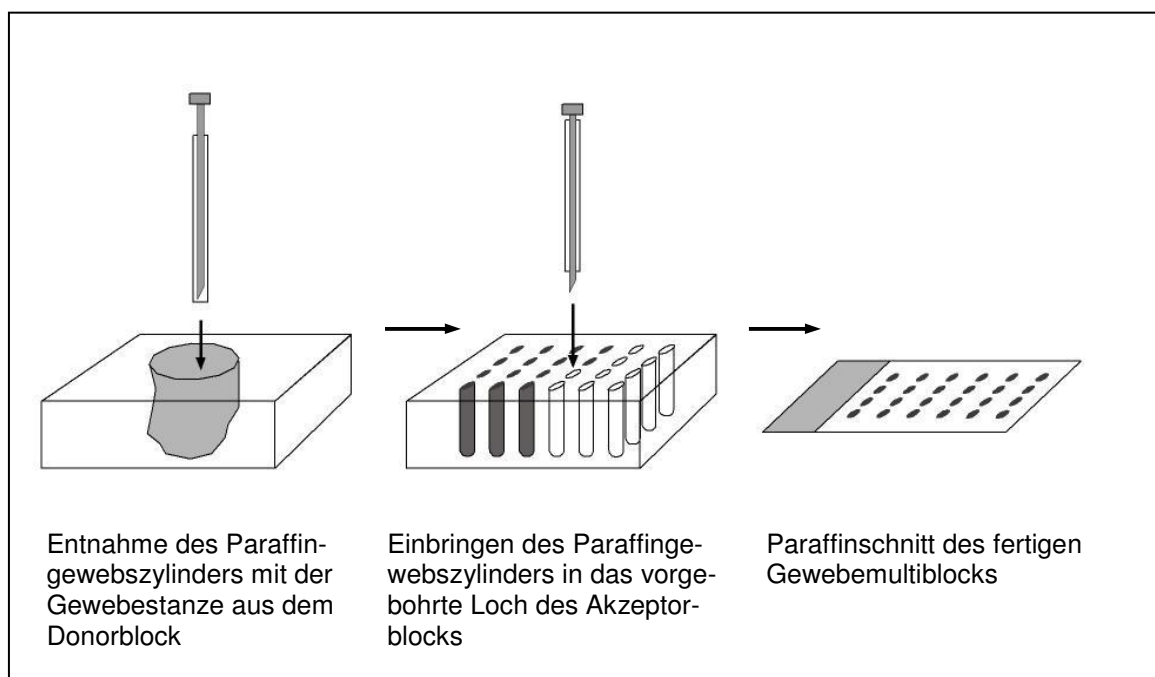


Abb. 10: Herstellung eines Gewebemultiblocks (schematisch)

Zunächst wurde die genaue Anordnung der Gewebestanzylinder im Akzeptorblock festgelegt und dieser zur besseren Orientierung in zwei Hälften eingeteilt.

Hälfte 1 bestand aus den vertikalen Spalten 1 bis 11, Hälfte 2 umfasste die vertikalen Spalten 12 bis 22. Auf diese Weise erhielt jede Stanze wie in einem Koordinatensystem eine definierte Lokalisation im Gewebemultiblock bestehend aus der vertikalen Spalten- und der horizontalen Zeilennummer. Zur schriftlichen Fixierung der Gewebemultiblockdaten wurde eine Access-Datei angelegt. In der zugehörigen Tabelle wurden zur exakten Identifizierung von jeder Stanze Position, Eingangsnummer und Histologie notiert.

Mit der selbst gefertigten Gewebestanze wurden nun manuell gezielt Gewebestanzzyylinder aus den tumorverdächtigen Arealen der Donorblöcke entnommen und möglichst niveaugleich in den Akzeptorblock eingeführt. Von jedem Donorblock wurden mindestens zwei, maximal vier Stenzen angefertigt und in die korrespondierenden, in größerer Entfernung voneinander befindlichen Positionen der zwei Akzeptorblock-Hälften gebracht.

Als weitere Orientierungshilfe auf dem Gewebemultiblock diente die Besetzung der jeweils ersten Position (linke obere Ecke von Hälfte 1 und 2) mit einer Melanombiopsie, die aufgrund ihrer charakteristischen Pigmentierung sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch gut zu erkennen war. Diesen Melanombiopsien entsprachen somit die Positionen 1-1 und 12-1 des Gewebemultiblocks.

Nach Auffüllen des Akzeptorblocks wurde die Paraffinoberfläche des Gewebemultiblocks leicht auf eine glatte Fläche gedrückt, so dass eventuell überstehende Stanzzyylinder eingeebnet wurden.

Abschließende Lagerung über Nacht bei 37°C im Brutschrank bewirkte ein Anhaften der einzelnen Stanzzyylinder am Rande der Stanzlöcher und verbesserte so den Kontakt zwischen den Paraffinstanzzyindern und dem Paraffin des Gewebemultiblocks.

Alle Maßnahmen am ersten Tag fanden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen statt.

Durchführung Tag 2**Schneiden des Gewebemultiblocks – Entparaffinierung – Vorbehandlung – Denaturierung – Hybridisierung**

Mit Hilfe eines herkömmlichen Schlittenmikrotoms (Reichert-Jung, jetzt Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) wurden bei -10°C bis 0°C ca. $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte vom Gewebemultiblock angefertigt und anschließend auf silanisierte Objektträger (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) aufgezogen.

Auf die Entparaffinierung des Gewebemultiblockschnitts mit Xylol für 2×10 min und 99,9% igem Ethanol für 2×5 min bei Raumtemperatur folgten eine thermische Antigendemaskierung in $0,01\ \text{M}$ Natriumcitrat ($\text{pH}\ 6,0$) bei 95°C für 40 min und ein konsekutiver Waschprozess in Aqua dest. bei Raumtemperatur für 2 min (Vorbehandlung). Um die Proteinstruktur im Hinblick auf die Zytokeratin-8-Färbung zu erhalten, wurde auf eine weitere, sonst meist routinemäßig durchgeführte Protease- und HCl-Vorbehandlung verzichtet.

An die fünfminütige Denaturierung des Tumorgewebes bei 72°C in $2 \times \text{SSC}$ und 70% igem Formamid schloss sich ein weiterer Waschprozess für 2 min in $2 \times \text{SSC}$ an.

Auf den noch feuchten Gewebemultiblockschnitt wurden $16\ \mu\text{l}$ der vordenaturierten LSI HER-2/neu SpectrumOrange / CEP 17 SpectrumGreen DNA-Sonde aufgebracht. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde der Objektträger mit einem Deckglas ($24 \times 60\ \text{mm}$, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland, zurechtgeschnitten auf eine Größe von $21 \times 37\ \text{mm}$) versehen und allseits mit Fixogum® (Marabu, Tamm, Deutschland) abgedichtet.

Den Herstellerangaben entsprechend erfolgte die Hybridisierung für 12 bis 14 Stunden bzw. über Nacht bei 37°C in einem HyBrite™ Denaturierungs- und Hybridisierungssystem.

Die Verarbeitung des Gewebemultiblocks am zweiten Tag oblag ausschließlich dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen.

Durchführung Tag 3**Nachbehandlung/Stringenzwaschung – Immunfluoreszenz zum Nachweis von Zytokeratin-8 – Zellkern-Gegenfärbung – Auswertung**

Nach Entfernen des Deckglases wurde die Posthybridisierungswaschung für 2 min in 2 x SSC und 0,3% NP-40 bei 72°C vorgenommen. Dieser stringente Waschvorgang sollte eine gründliche Entfernung von inkomplett und unspezifisch gebundenem Sondenmaterial bewirken. Eine anschließende Behandlung in Tris-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur diente der Vorbereitung für eine optimale Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz.

Auf den noch feuchten Objektträger wurden 200 µl des monoklonalen Primärantikörpers (Anti-Zytokeratin-8, Klon Ks 8.7, Verdünnung 1:100, Cat. No. 61038, Progen, Heidelberg) gegeben, wobei die Inkubationszeit 1 h bei Raumtemperatur betrug.

Ein erneuter Waschvorgang in Tris-Puffer war der Überschichtung mit 200 µl von einem Rhodamin-markierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-Rhodamin-F(ab')₂-Fragment, Verdünnung 1:10, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) für 1 h vorangestellt. Daran schlossen sich ein weiterer Waschschrift mit Tris-Puffer und die Gegenfärbung der Zellkerne mit 20 µl DAPI an. Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde der Objektträger mit einem Deckglas der Größe 24 x 60 mm versehen.

Die Arbeitsschritte von Tag 3 wurden vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Eine kursorische Auswertung des Gewebemultiblockschnitts erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Tübingen an einem Zeiss Axioskop mit einer HBO 100 Quecksilberdampflampe (HBO 103 W/2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), einem Dreifachbandpass-Filter-Set (Dapi/Orange/Green, Chroma Technology

Corporation) und drei Einfachbandpass-Filter-Sets (Dapi, Orange, Green, Chroma Technology Corporation). Zur Orientierung auf dem Gewebemultiblock und zum Aufsuchen der einzelnen Positionen wurde das 10er Objektiv (Plan-Neofluor 10x, Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe des 40er Objektivs (Plan-Neofluor 40x, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden fehlende Stenzen und solche Stenzen ermittelt, die kein Tumorgewebe enthielten. Bei gleicher Vergrößerung fand eine orientierende Auswertung jeder vorhandenen und tumorenhaltenden Stanze statt. Hierbei wurde eine vorläufige Einteilung in Stenzen mit keiner, mit einer Low-Level- und High-Level-Amplifikation vorgenommen.

Der genauen Auszählung von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen lagen die Ergebnisse der Gewebemultiblock-Hälfte 2 zugrunde. Sie erfolgte am Olympus Fluoreszenzmikroskop BX 60 der Universitäts-Frauenklinik Tübingen unter Verwendung des 100er Ölimmersionsobjektivs. Dabei wurde prinzipiell in gleicher Weise verfahren wie bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Tumorabklatschpräparate. Von großer Wichtigkeit waren Orientierung im Gewebemultiblockschnitt sowie sicheres Auffinden und Kontrollieren der exakten Position auszuwertender Stenzen durch ständigen Wechsel zum 10er Objektiv. Vor der Auszählung der 60 Tumorzellkerne wurde jede Stanze abgefahren und grob durchgemustert, um einen Gesamteindruck von der Beschaffenheit des Tumors zu erhalten und die genauen Grenzen der Stanze festzulegen. Zusätzlich zur Auswertung der HER-2/neu-Gensignale und der CEP 17-Chromosomensignale wurde die Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz auf Vorhandensein und Intensität überprüft.

Dokumentation

Schriftliche Fixierung, Ermittlung von Vysis-Ratio, endgültige Einteilung in keine Amplifikation, Low-Level- und High-Level-Amplifikation sowie fotografische Dokumentation decken sich mit den Ausführungen unter 3.2.2. ab Seite 30.

3.2.6. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Paraffinschnitten

Im Rahmen diagnostischer Routineuntersuchungen waren vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen bei 24 der 150 Mammakarzinomfälle Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE-) Präparaten durchgeführt worden (darunter eine Doppelbestimmung). Die Ergebnisse dieser FISH-Analysen wurden als Vergleichswerte in die vorliegende Dissertation aufgenommen.

Abschließend sind in Tabelle 2 die wichtigsten Arbeitsschritte zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten, konventionellen Paraffinschnitten und am Gewebemultiblockschnitt zusammengefasst und die drei unterschiedlichen Verfahren einander gegenübergestellt.

Tab. 2: Gegenüberstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten, konventionellen Paraffinschnitten und am Gewebemultiblockschnitt

	Tumorabklatschpräparate	Paraffinschnitte konventionell	Paraffinschnitt Gewebemultiblock
Fixierung	Merckofix®-Fixations-spray	- 12-24 h in 4,5% Formaldehyd, phosphatgepuffert, pH 7,0 - über Nacht Trocknen bei 37°C	- 12-24 h in 4,5% Formaldehyd, phosphatgepuffert, pH 7,0 - über Nacht Trocknen bei 37°C
Entparaffinierung	—	- 2 x 10 min in Xylol bei Raumtemperatur - 2 x 5 min 99,9% Ethanol	- 2 x 10 min in Xylol bei Raumtemperatur - 2 x 5 min 99,9% Ethanol

Vorbehandlung	<ul style="list-style-type: none"> - 15-30 min in 2 x SSC + 0,1% NP-40 bei 37°C - je 2-5 min in 70%, 85% und 99,9% Ethanol 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 min in 0,2 N HCl bei Raumtemperatur - 30 min in 1 M NaSCN bei 80°C - 10 min Protease-Behandlung bei 37°C - 10 min in 4,5% Formaldehyd, phosphatgepuffert, pH 7,0 	40 min in 0,01 M Natriumcitrat, pH 6,0 bei 95°C
Denaturierung	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min bei 73°C im HyBrite™-System - simultan 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min in 70% Formamid und 2 x SSC bei 72°C - getrennt 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min in 70% Formamid und 2 x SSC bei 72°C - getrennt
Sondenmaterial	<ul style="list-style-type: none"> - 10 µl Sonden-Kit pro Präparat 	<ul style="list-style-type: none"> - 1µl Sonden-Kit pro Paraffinschnitt 	<ul style="list-style-type: none"> - 16 µl Sonden-Kit pro Gewebemultiblock-schnitt
Hybridisierung	14-18 h bei 37°C im HyBrite™-System	ca. 16 h bei 37°C in feuchter Kammer	ca. 12 h bei 37°C im HyBrite™-System
Nachbehandlung/ Stringenzwaschung	<ul style="list-style-type: none"> - 2 min in 0,5 x SSC + 0,1% NP-40 bei 72°C - 2 min in 2 x SSC + 0,1% NP-40 bei Raumtemperatur 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur - 2 min in 2 x SSC + 0,3% NP-40 bei 72 °C - 5-50 sec in 2 x SSC bei Raumtemperatur 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 min in 2 x SSC + 0,3% NP-40 bei 72°C
Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz	—	—	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation in Tris-Puffer - 1 h Überschichten mit 200 µl Primärantikörper (Anti-Zytokeratin-8, Klon Ks 8.7, 1:100) - Spülen mit Tris-Puffer - 1 h Überschichten mit 200 µl Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-Rhodamin-F(ab')₂-Fragment, 1:10) - Spülen mit Tris-Puffer
Zellkern-Gegenfärbung	10 µl DAPI pro Präparat	1,5 µl DAPI pro Paraffinschnitt	20 µl DAPI pro Gewebemultiblock-schnitt

4. Ergebnisse

4.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten

In der vorliegenden Dissertation wurden von 150 verschiedenen Mamma-karzinomen Tumorabklatschpräparate erstellt und diese mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf eine HER-2/neu-Genamplifikation untersucht. Dabei wurde der PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit (Abbott/ Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) verwendet, der herstellerseits für die Anwendung an Interphase-Zellkernen von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE-) Gewebeproben optimiert wurde.

4.1.1. Etablierung der Methode an Tumorabklatschpräparaten

Die Übertragung der FISH-Analyse mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit auf Tumorabklatschpräparate machte eine vom Protokoll abweichende Vorgehensweise erforderlich. Mit diesem modifizierten Verfahren sollten auf möglichst einfachem und schnellem Wege spezifische und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Mit dem Merckofix®-Fixationsspray (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) waren alle 150 Tumorabklatschpräparate gut fixiert, in keinem Fall kam es zum Verlust oder Abschwimmen von Zellmaterial.

In Studien der Firma Abbott/Vysis zeigte vor allem die Hybridisierung eine Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Auf die Denaturierung hingegen hatten unterschiedliche Temperaturen und Zeiten keinen wesentlichen Einfluss. Beide Parameter wurden entsprechend den Empfehlungen für FFPE-Präparate gewählt (Denaturierung für 5 min bei 73°C und Hybridisierung für 14-18 h bei 37°C im HyBrite™-System) und waren in dieser Kombination auch für Tumorabklatschpräparate geeignet.

Die Signalintensität wurde in diesen Studien vor allem von der Salzkonzentration der Stringenzwaschung beeinflusst. Je stärker die Salzkonzentration, desto intensiver die Signale, desto geringer aber die Entfernung von inkomplett und unspezifisch gebundenem Sondenmaterial. Um ein möglichst vollständiges Lösen von unspezifischer und überschüssiger Sonde und damit eine Steigerung der Spezifität zu erreichen, wurde eine Nachbehandlung mit zunächst 0,5 x SSC + 0,1% NP-40 und anschließend 2 x SSC + 0,1% NP-40 durchgeführt. Dabei ließ sich kein Intensitätsverlust der Signale beobachten.

4.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Tumorabklatschpräparate mit dem Fluoreszenzmikroskop umfasste die Aspekte Schichtdicke, Quantität vorhandener Tumorzellkerne, Hintergrundsbeschaffenheit sowie Intensität und Qualität der Signale.

Aufgrund der Abdruck- bzw. Abklatschtechnik lagen die Tumorzellen zumeist einzeln verstreut oder in lockeren Haufen bei vollständigen Zellkernen vor, teilweise traten sie in Verbänden mit Zellkernüberlappungen auf.

Im Fall 100 konnten die für eine repräsentative Auswertung erforderlichen 60 Tumorzellkerne nicht erreicht und lediglich 29 Tumorzellkerne ausgezählt werden.

Der Hintergrund war bei 76 Tumorabklatschpräparaten (57,1%) schwach ausgeprägt oder fehlte ganz, bei 57 Präparaten (42,9%) war er vorhanden, ohne jedoch die Auswertung der Sondensignale negativ zu beeinflussen. Hingegen machte ein starker Hintergrund aus zytoplasmatischem und erythrozytärem Detritus mit zum Teil unspezifischen fluoreszierenden Partikeln bei 17 Präparaten eine sichere und eindeutige Auszählung der HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale unmöglich. Unter Verwendung einer neuen Kit-Charge und eines zweiten Tumorabklatschpräparats wurde bei diesen 17 Fällen eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in unterschiedlichen Analysendurchläufen wiederholt. Bei einwandfreier Beurteilbarkeit der externen Positivkontrollen ließ sich in keinem Fall eine Befundänderung herbeiführen.

Die 17 Fälle wurden als Versager eingestuft und blieben in der Gesamtauswertung unberücksichtigt. Ihr prozentualer Anteil betrug 11,3%.

Die übrigen 133 Tumorabklatschpräparate (88,7%) zeigten deutlich erkennbare orange fluoreszierende HER-2/neu-Gensignale und grün fluoreszierende CEP 17-Chromosomensignale von ausreichender Intensität. Während die HER-2/neu-Gensignale meist kleiner und von kompakt-ovaler Form waren, erschienen die CEP 17-Chromosomensignale oftmals größer und wiesen eine diffus-ovale Form auf. Teilweise fanden sich in den Tumorzellkernen unspezifische grün fluoreszierende Signale, die aufgrund ihrer geringeren Größe im Vergleich zu den CEP 17-Chromosomensignalen abgegrenzt werden konnten. Insbesondere bei den HER-2/neu-Gensignalen traten gesplittete Signale auf. In 14 Fällen mit einer Amplifikation bzw. High-Level-Amplifikation war durch eine sehr dichte Lagerung der HER-2/neu-Gensignale (Clusterbildung) eine exakte quantitative Erfassung der Signale nicht möglich.

4.1.3. Dokumentation

Zur Veranschaulichung der schriftlichen Dokumentation soll stellvertretend der Fall 21 in detaillierter Weise dargestellt werden:

Dem Protokoll der Firma Abbott/Vysis entsprechend sind in der Auswertungstabelle I (siehe Tabelle 3, Seite 47) die ausgezählten HER-2/neu-Gensignale (y-Achse) und die CEP 17-Chromosomensignale (x-Achse) bei 60 Tumorzellkernen vermerkt. Daraus wird zum Beispiel ersichtlich, dass 44 Tumorzellkerne sowohl 2 HER-2/neu-Gensignale als auch 2 CEP 17-Chromosomensignale besitzen.

Parallel zur fluoreszenzmikroskopischen Auszählung der HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale wurde in Auswertungstabelle II (siehe Tabelle 4, Seite 47) die genaue Signalkombination der 60 Tumorzellkerne fortlaufend eingetragen. Die mit „s“ gekennzeichneten Tumorzellkerne wiesen gesplittete HER-2/neu-Gensignale auf.

Tab. 3: Auswertungstabelle I nach Abbott/Vysis für Fall 21

HER-2	CEP 17											Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+	
0												
1												
2		6	44									50
3			4	2								6
4			1	1	2							4
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11-15												
16-20												
21-30												
31-40												
41-60												
60+												
Total		6	49	3	2							60

Tab. 4: Auswertungstabelle II zur schriftlichen Fixierung der Signalkombinationen von 60 ausgezählten Tumorzellkernen für Fall 21
(s = gesplittetes bzw. gesplittete HER-2/neu-Gensignale)

Tumorzellkern-Nr.	HER-2/neu / CEP 17											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2 / 2	11	2 / 2	21	2 / 2	31	2 / 2	41	2 / 2	51	2 / 2	
2	2 / 2	12	2 / 2	22	2 / 2 _s	32	2 / 2	42	2 / 2	52	2 / 2 _s	
3	3 / 3	13	2 / 2	23	2 / 2	33	2 / 2	43	2 / 1	53	2 / 2 _s	
4	2 / 2	14	2 / 2	24	3 / 3 _s	34	2 / 2	44	2 / 2	54	4 / 2 _s	
5	2 / 2 _s	15	4 / 4	25	2 / 2	35	2 / 2	45	2 / 2	55	2 / 2 _s	
6	2 / 2	16	2 / 2	26	2 / 2	36	2 / 2	46	2 / 2	56	2 / 2	
7	2 / 2	17	3 / 2 _s	27	2 / 1 _s	37	2 / 2	47	2 / 1	57	2 / 2 _s	
8	4 / 3	18	2 / 2	28	3 / 2 _s	38	2 / 2	48	2 / 1	58	2 / 2 _s	
9	4 / 4	19	2 / 2	29	2 / 2 _s	39	2 / 2 _s	49	2 / 2 _s	59	2 / 1	
10	3 / 2	20	2 / 2	30	3 / 2 _s	40	2 / 2 _s	50	2 / 1	60	2 / 2	

Im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde von jedem Fall eine Serie von Aufnahmen angefertigt. Diese Fotos wurden durch ein „S“ gekennzeichnet und chronologisch durchnummeriert. Einige Beispiele für Aufnahmen an Tumorabklatschpräparaten und am Gewebemultiblockschnitt sind nachfolgend dargestellt (Abbildungen 11 bis 16).

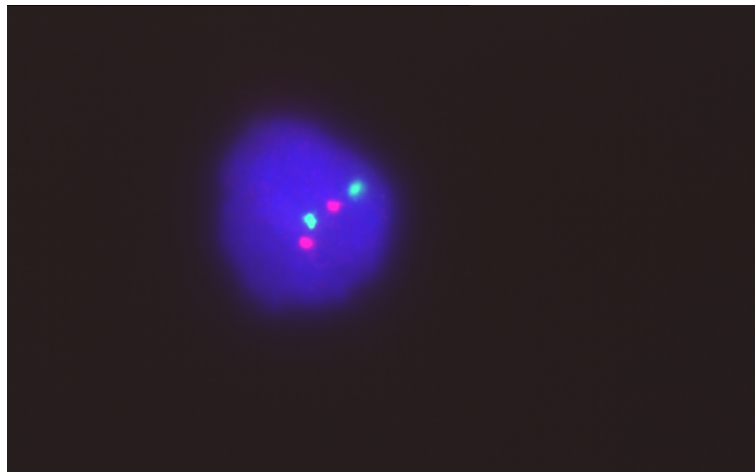


Abb. 11: Tumorzellkern mit 2 HER-2/neu Gensignalen (orange) und 2 CEP 17-Chromosomensignalen (grün), Fall 51 am Tumorabklatschpräparat

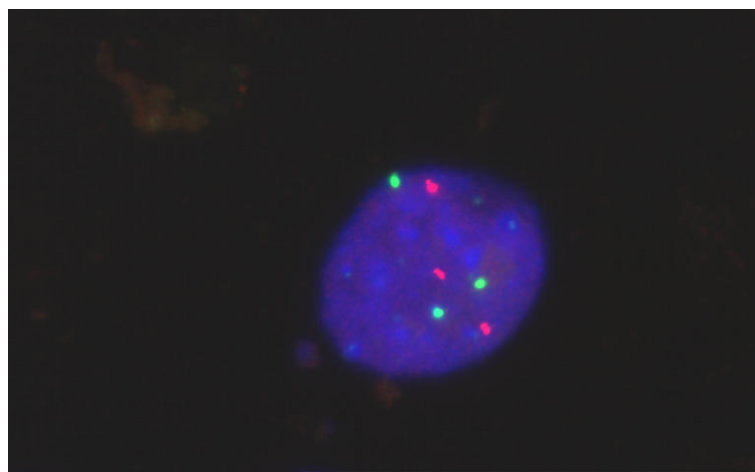


Abb. 12: Tumorzellkern mit 3 HER-2/neu-Gensignalen (orange) und 3 CEP 17-Chromosomensignalen (grün), Fall 30 am Tumorabklatschpräparat

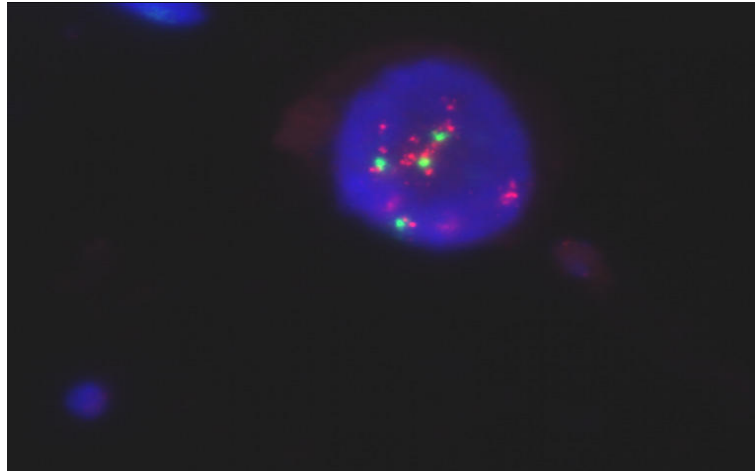


Abb. 13: Tumorzellkern mit 25 HER-2/neu-Gensignalen (orange, Clusterbildung) und 4 CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation, Fall 33 am Tumorabklatschpräparat

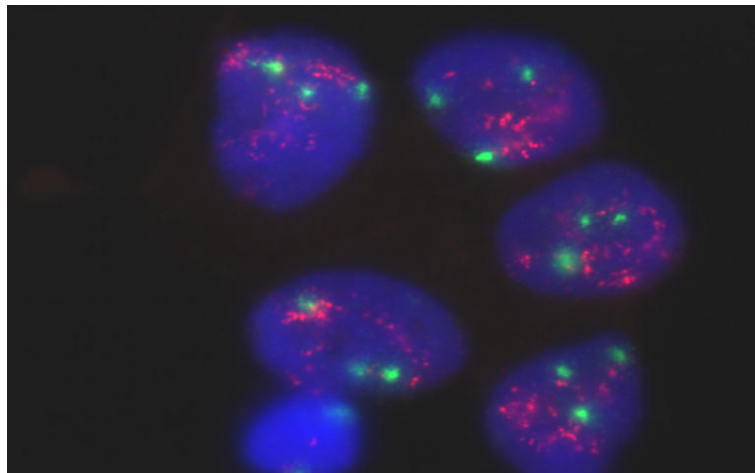


Abb. 14: 5 Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Gensignalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation (30/3, 33/3, 27/3, 28/3 und 28/3, jeweils Clusterbildung, unterschiedliche Schärferebenen), Fall 33 am Tumorabklatschpräparat

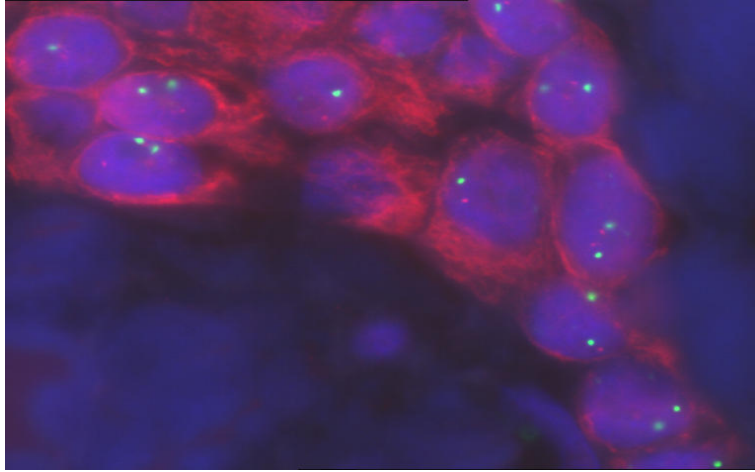


Abb. 15: Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Signalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) (auf dieser Schärfenebene: 2/2, 2/2, 2/2, 1/1 und 1/1), Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz, Fall 14 am Gewebemultiblockschnitt

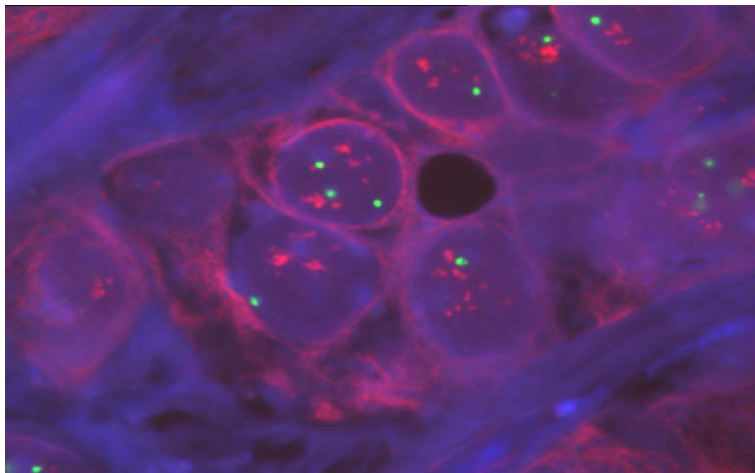


Abb. 16: 4 Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Signalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation (9/1, 16/3, 15/1 und 13/1, teilweise Clusterbildung, unterschiedliche Schärfenebenen), Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz, Fall 63 am Gewebemultiblockschnitt

4.1.4. HER-2/neu-Status nach Vysis

Die Vysis-Ratio ist der Quotient aus den durchschnittlichen Werten der HER-2/neu-Gen-signale und der CEP 17-Chromosomensignale von 60 Tumorzellkernen. Die Ergebnisse der 133 ausgewerteten Tumorabklatschpräparate wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

119 Fälle (89,5%) zeigten bei einer Ratio $< 2,0$ keine HER-2/neu-Genamplifikation. In 14 Fällen (10,5%) konnte bei einer Ratio $\geq 2,0$ eine HER-2/neu-Genamplifikation nachgewiesen werden. Bei einem dieser amplifizierten Fälle ließen sich nur 29 Tumorzellkerne auszählen (Fall-Nr. 100). Eine grenzwertige Ratio mit 1,9 fand sich in den Fällen 9 und 35, die per definitionem keine Amplifikation aufweisen und daher der Gruppe der nicht amplifizierten Fälle zugerechnet wurden. Die prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio gibt Abbildung 17 wieder (siehe unten).

In der Gesamtauswertungstabelle (siehe Anhang, Seite 113 bis 119) ist das genaue Resultat für jedes Tumorabklatschpräparat festgehalten.

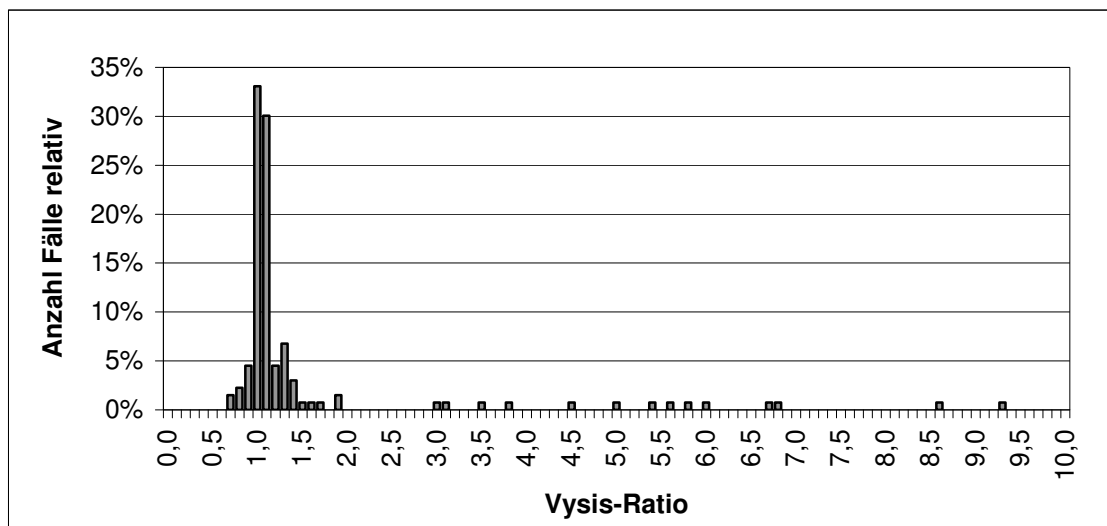


Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (n = 133)

4.1.5. HER-2/neu-Status nach Ventana

In Anlehnung an das Inform®-HER-2/neu Probe-Protokoll (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) und den zweiten Expertenworkshop zu „Neuen Entwicklungen bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms“ von 1999 (Kaufmann und Kanz 2000) wurde anhand der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern eine Einteilung in nicht amplifizierte (keine Amplifikation/NA), niedrig amplifizierte (Low-Level-Amplifikation/LLA) und hoch amplifizierte (High-Level-Amplifikation/HLA) Fälle vorgenommen (siehe 3.2.2., Seite 30). Bei Ergebnissen größer 4 und kleiner/gleich 10 lag eine Low-Level-Amplifikation vor, darüber handelte es sich um eine High-Level-Amplifikation.

Danach ergab sich bei den ausgewerteten 133 Tumorabklatschpräparaten für 107 Fälle keine Amplifikation (80,5%), für 12 Fälle eine Low-Level-Amplifikation (9,0%) und für 14 Fälle eine High-Level-Amplifikation (10,5%).

In Abbildung 18 (siehe Seite 53) ist die prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern dargestellt.

Tumorabklatschpräparate ohne Amplifikation (107) und mit einer High-Level-Amplifikation (14) stimmten mit den nach Vysis nicht amplifizierten und amplifizierten Fällen überein. Somit waren 121 Ergebnisse identisch (91,0%).

Bei 12 Präparaten wurde eine Low-Level-Amplifikation nach Ventana durch Ermittlung der Vysis-Ratio nicht erfasst. Während ein Fall mit einer Low-Level-Amplifikation eine grenzwertige Vysis-Ratio von 1,9 zeigte (Fall-Nr. 35), wies der zweite Grenzfall nach Vysis weder eine Low-Level- noch eine High-Level-Amplifikation auf (Fall-Nr. 9).

Diese diskrepanten Ergebnisse machten eine weitere Abklärung unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Anzahl von CEP 17-Chromosomensignalen pro Tumorzellkern, der häufigsten Signalkombinationen und der minimalen und maximalen Werte von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen erforderlich.

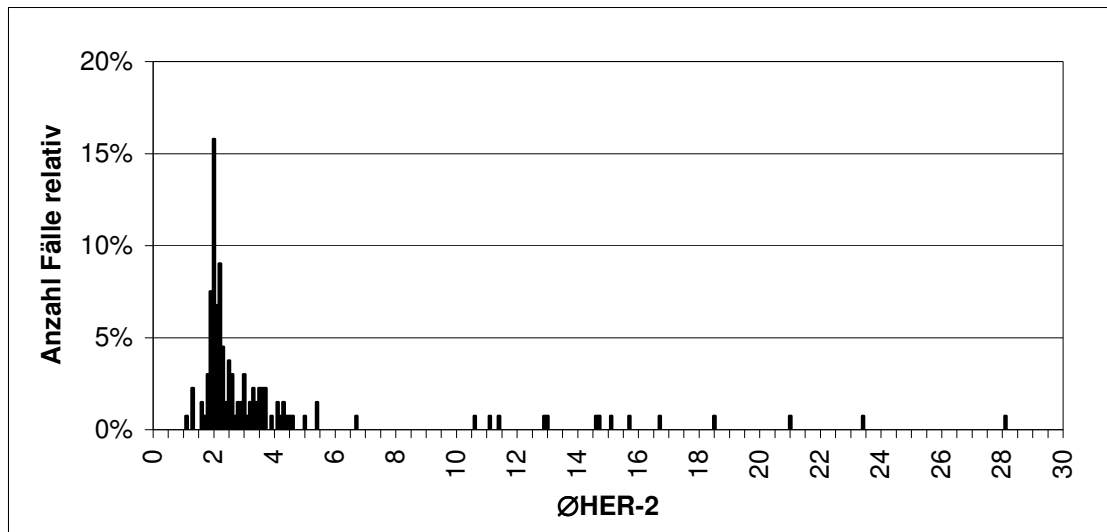


Abb. 18: Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern ($\bar{\text{ØHER-2}}$) an Tumorabklatschpräparaten (n = 133)

4.1.6. Aneuploidie bei Fällen mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana

Tabelle 5 (siehe Seite 55) fasst die 12 Fälle mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana zusammen. Mit Hilfe der durchschnittlichen Anzahl der CEP 17-Chromosomensignale pro Tumorzellkern, der häufigsten Signalkombinationen und der minimalen und maximalen Werte von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen können im Einzelfall Aussagen über das Vorhandensein einer Aneuploidie und/oder einer Low-Level-Amplifikation gemacht werden.

Als Aneuploidie wird eine Veränderung des vollständigen diploiden (euploiden) Chromosomensatzes durch numerische Chromosomenaberrationen bezeichnet. Über die gleichzeitige Darstellung von HER-2/neu-Genlokus und Zentromer des Chromosoms 17 mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit läßt sich feststellen, ob eine Vermehrung der HER-2/neu-Gensignale auf eine Vervielfachung von Chromosom 17 zurückzuführen ist oder ob tatsächlich eine HER-

2/neu-Genamplifikation vorliegt. Da lediglich eine quantitative Erfassung von Chromosom 17 erfolgt, sind keine Rückschlüsse auf den gesamten Chromosomensatz möglich. Bei numerischen Aberrationen von Chromosom 17 handelt es sich entweder um eine Polysomie, wie beispielsweise eine Tri-, Tetra- oder Pentasomie, oder aber um eine Monosomie.

Bei drei Tumorabklatschpräparaten mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana (Fall-Nr. 6, 117 und 129) konnte eine Aneuploidie erfasst werden. Anhand der häufigsten Signalkombinationen wurden die vorherrschenden Polysomie-Formen ermittelt, wobei in allen drei Fällen verschiedene Polysomie-Formen (Tri- bis Heptasomie) kombiniert auftraten (siehe Tabelle 5, Seite 55).

Bei Betrachtung der minimalen und maximalen Werte von CEP 17-Chromosomensignalen kamen neben den vorherrschenden noch weitere Polysomien bezüglich Chromosom 17 vor, jedoch in einer deutlich geringeren Anzahl von Tumorzellkernen. Da HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale gleichermaßen vermehrt waren, konnte in diesen drei Tumorabklatschpräparaten eine Low-Level-Amplifikation ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu ergab sich für Fall 35 eine Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene bei normaler durchschnittlicher Anzahl von Chromosom 17. Hierbei handelte es sich um eine Low-Level-Amplifikation nach Ventana (\emptyset HER-2 = 4,4) mit grenzwertiger Vysis-Ratio (1,9).

Die verbleibenden 8 Fälle (Fall-Nr. 5, 24, 39, 55, 62, 68, 107 und 128) ließen sich bei Berücksichtigung der oben genannten Kriterien nicht genau zuordnen. Eine Abgrenzung von einer Aneuploidie gegenüber einer tatsächlichen Amplifikation war hier nicht möglich, da sowohl Anhaltspunkte für eine Aneuploidie als auch für eine Amplifikation um in der Regel 1 bis 3 HER-2/neu-Gene vorlagen. In Fall 128 fanden sich bei gemeinsam auftretender Amplifikation um meist 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (vor allem Trisomie) zusätzlich Tumorrisenzellen mit einer Kombination von bis zu 20 HER-2/neu-Gensignalen und 14 CEP 17-Chromosomensignalen.

Tab. 5: Tumorablatschpräparate mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana (n = 12)

Fall Nr.	Ratio	Ø HER-2	Ø CEP17	Häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Bemerkungen
5	1,3	5,0	3,8	5/4 (17), 6/4 (14), 4/4 (11)	3-7	2-4	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (vor allem Tetrasomie)
6	1,1	4,6	4,1	3/3 (20), 6/5 (7), 5/5 (6), 6/6 (6)	3-7	2-7	Polysomie (vor allem Tri-, Penta- und Hexasomie)
24	1,3	4,5	3,3	5/4 (16), 4/4 (7), 5/3 (6), 6/4 (6)	2-6	1-5	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (Tri- und Tetrasomie)
35	1,9	4,4	2,4	3/2 (23), 4/2 (11)	2-8	1-4	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene
39	1,4	5,4	3,9	6/4 (15), 5/4 (11), 4/4 (6)	2-8	2-6	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (vor allem Tetrasomie)
55	1,6	4,3	2,8	4/2 (20), 4/3 (13), 3/2 (6)	2-8	2-5	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (vor allem Trisomie)
62	1,1	4,1	3,6	4/4 (21), 5/4 (14), 4/3 (5), 5/3 (5)	2-6	2-5	Amplifikation um 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (Tri- und Tetrasomie)
68	1,1	4,1	3,8	4/4 (23), 4/3 (9), 5/4 (9), 5/5 (9)	2-5	1-5	Amplifikation um 1 HER-2/neu-Gen und Polysomie (Tri-, Tetra- und Pentasomie)
107	1,4	6,7	4,9	7/5 (13), 6/5 (7), 6/4 (6), 7/4 (6)	4-9	2-7	Amplifikation um 1 bis 3 HER-2/neu-Gene und Polysomie (Tetra- und Pentasomie)
117	1,0	4,3	4,1	4/4 (15), 5/5 (14)	2-6	2-6	Polysomie (vor allem Tetra- und Pentasomie)
128	1,4	5,4	3,9	4/3 (12), 3/3 (7), 5/3 (5)	2-20	1-14	Amplifikation um meist 1 bis 2 HER-2/neu-Gene und Polysomie (vor allem Trisomie)
129	1,1	4,2	3,9	4/4 (23), 4/3 (10), 5/5 (10), 3/3 (5)	3-5	3-5	Polysomie (Tri-, Tetra- und Pentasomie)

4.1.7. Aneuploidie bei Fällen mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana

Tab. 6: Tumorabklatschpräparate mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana (n = 14)

Fall. Nr.	Ratio	Ø HER-2	Ø CEP17	Häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Bemerkungen
23	3,1	16,7	5,4	16-20/6 (10), 11-15/5 (8), 16-20/7 (7)	5-27	1-8	Amplifikation und Polysomie (vor allem Penta-, Hexa- und Heptasomie)
33	6,8	23,4	3,4	21-30/3 (19), 21-30/4 (16), 16-20/3 (7)	14-35	2-4	Amplifikation und Polysomie (Tri- und Tetrasomie)
38	3,5	13,0	3,7	11-15/3 (16), 11-15/4 (16)	6-29	2-6	Amplifikation und Polysomie (vor allem Tri- und Tetrasomie)
48	6,7	28,1	4,2	21-30/4 (16), 21-30/3 (11), 21-30/5 (10)	18-41	3-6	Amplifikation und Polysomie (vor allem Tri-, Tetra- und Pentasomie)
53	8,6	18,5	2,1	16-20/2 (29), 11-15/2 (11), 21-30/2 (11)	8-36	1-4	Amplifikation
63	5,8	15,7	2,7	16-20/3 (27), 11-15/2 (13), 11-15/3 (13)	10-24	2-3	Amplifikation und Polysomie (Trisomie)
94	4,5	11,4	2,5	11-15/3 (21), 11-15/2 (13)	5-17	1-4	Amplifikation und Polysomie (Trisomie)
96	3,8	14,7	3,9	11-15/4 (23), 11-15/3 (9), 16-20/3 (8), 16-20/4 (7), 11-15/5 (7)	10-23	3-6	Amplifikation und Polysomie (Tri-, Tetra- und Pentasomie)
100	6,3	15,1	2,4	11-15/2 (10), 16-20/3 (4), 16-20/2 (3), 21-30/4 (3)	7-23	1-4	Amplifikation und Polysomie (Tri- und Tetrasomie)
101	5,0	14,6	3,0	11-15/2 (11), 16-20/4 (8), 11-15/3 (7)	6-29	1-5	Amplifikation und Polysomie (vor allem Tri- und Tetrasomie)
112	5,6	11,1	2,0	11-15/2 (33), 10/2 (13), 9/2 (7)	7-15	1-3	Amplifikation
115	9,3	12,9	1,4	11-15/1 (17), 11-15/2 (11), 8/1 (9)	7-28	1-2	Amplifikation und Monosomie
120	3,0	10,6	3,5	11-15/4 (15), 11-15/3 (8), 9/4 (7)	6-23	2-5	Amplifikation und Polysomie (Tri- und Tetrasomie)
126	5,4	21,0	3,9	21-30/4 (25), 16-20/4 (11)	7-33	1-6	Amplifikation und Polysomie (vor allem Tetrasomie)

Eine analoge Aufschlüsselung der Fälle mit einer High-Level-Amplifikation belegte, dass bei 11 Tumorabklatschpräparaten (Fall-Nr. 23, 33, 38, 48, 63, 94, 96, 100, 101, 120 und 126) zusätzlich zur Amplifikation eine begleitende Polysomie zumeist mit einer Kombination verschiedener Polysomie-Formen auftrat (siehe Tabelle 6, Seite 56).

Bei einem Tumorabklatschpräparat (Fall-Nr. 115) ging die Amplifikation mit einer Monosomie einher.

Eine isolierte Amplifikation ohne gleichzeitige Aneuploidie ergab sich für die Fälle 53 und 112.

4.1.8. Aneuploidie bei Fällen ohne eine Amplifikation nach Ventana

Aus der Gesamtauswertungstabelle im Anhang (siehe Seite 113 bis 119) ist zu entnehmen, dass von den insgesamt 107 nach Ventana nicht amplifizierten Fällen 60 eine normale durchschnittliche Anzahl der CEP 17-Chromosensignale aufwiesen.

Bei 14 Präparaten ließ sich eine Aneuploidie im Sinne einer Polysomie von Chromosom 17 feststellen, während in 5 Fällen (Fall-Nr. 32, 44, 56, 65 und 130) eine Monosomie von Chromosom 17 vorlag.

Für die übrigen 28 Präparate war bei dieser differenzierten Betrachtungsweise keine definitive Zuordnung möglich.

4.2. Doppelmarkierung am Gewebemultiblockschnitt

Um die Ergebnisse der Tumorabklatschpräparate hinsichtlich ihrer Wertigkeit im Vergleich zu Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten einordnen zu können, wurde an einem Gewebemultiblockschnitt eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation durchgeführt. Mittels Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz erfolgte zusätzlich eine Markierung von Epithel- und Tumorzellen

zur besseren Identifizierung von Tumorgewebe bei insbesondere lobulären und stark entzündlichzellig infiltrierten Mammakarzinomen sowie Mammakarzinomen mit geringem Zellgehalt.

Bei Erstellung des Gewebemultiblocks musste auf 25 Fälle verzichtet werden, da die entsprechenden Paraffinblöcke Bestandteil anderer laufender Studien waren. Eine mangelnde Qualität des Paraffins verhinderte bei 8 Blöcken eine Entnahme von Paraffingewebszylindern. Somit waren im Gewebemultiblock insgesamt 117 der ursprünglich 150 Fälle vertreten, die anhand von Tumorabklatschpräparaten auf eine HER-2/neu-Genamplifikation untersucht worden waren.

4.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Eine erste kursorische Auswertung des Gewebemultiblockschnitts diente der Überprüfung der Stenzen auf Vollständigkeit und Vorhandensein von Tumorgewebe sowie auf Qualität von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz. Nach dieser Beurteilung waren 63 Ausfälle bei insgesamt 256 im Gewebemultiblock enthaltenen Stenzen mit folgenden Ursachen zu verzeichnen:

Bei 19 Paraffingewebszylindern war es zu einem kompletten Abschwimmen des Schnitts gekommen, während bei 4 Stenzen der Schnitt zerrissen und gerollt war, so dass die Übereinanderlagerung von mehreren Schichten eine Auswertung nicht gestattete. 32 Paraffingewebszylinder enthielten kein Tumorgewebe. Eine zu geringe Intensität der Sondensignale machte in 8 Stenzen eine sichere Beurteilung von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen unmöglich. Abbildung 19 (siehe Seite 59) gibt die prozentuale Verteilung der verschiedenen Gründe für die 63 Ausfälle am Gewebemultiblock wieder.

Obwohl 63 Stenzen im Gewebemultiblockschnitt nicht auswertbar waren, blieben lediglich 16 Fälle ohne Ergebnis (13,7%), da 106 Fälle durch zwei Stenzen in korrespondierenden Positionen von Gewebemultiblock-Hälfte 1 und

2 repräsentiert wurden (Doppelbesetzung) und in 11 Fällen eine Vierfachbesetzung vorlag.

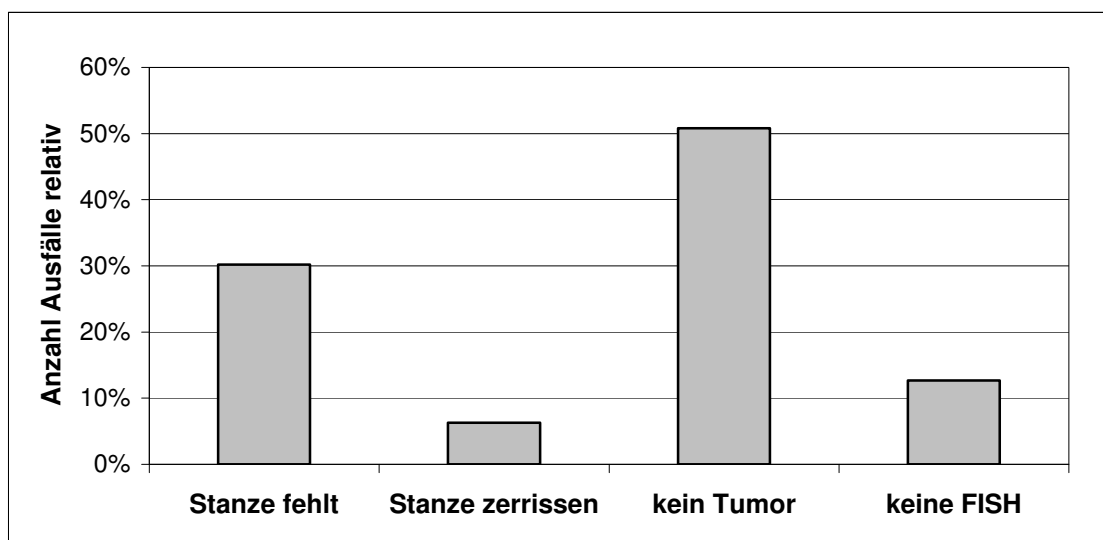


Abb.19: Prozentuale Verteilung der Gründe für die Ausfälle am Gewebemultiblockschnitt (n = 63)

Die endgültige Auswertung der übrigen 193 Stanzungen bzw. 101 Fälle erfolgte an der Gewebemultiblock-Hälfte 2. Bei den oben erwähnten Ausfällen wurde auf entsprechende Stanzungen der Gewebemultiblock-Hälfte 1 zurückgegriffen. Aufgrund der Vierfachbesetzung wurden in 7 Fällen (Fall-Nr. 6, 19, 30, 34, 35, 47 und 49) jeweils zwei Stanzungen ausgewertet, so dass insgesamt 108 Analysen am Gewebemultiblockschnitt vorgenommen wurden.

Die genaue Auszählung schloss eine Beurteilung von Zellzahl, Vorhandensein und Beschaffenheit des Hintergrunds sowie Intensität der Sondensignale und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz mit ein.

Häufig lagen die Tumorzellkerne dicht zusammen und überlappten sich stellenweise.

In 192 Stanzeln mit einem Durchmesser von 1 mm waren quantitativ ausreichend Tumorzellkerne vorhanden, während in einer Stanze nur 37 Tumorzellkerne ausgezählt werden konnten (Fall-Nr. 107).

Im Gewebemultiblockschnitt war der Hintergrund kaum ausgeprägt. Vielmehr traten Überlagerungen der Tumorzellkerne durch Zytoplasma auf, das nebel- und schleierartig imponierte, ohne dabei die Beurteilung der Sondersignale zu beeinträchtigen.

Die 193 Stanzeln wiesen deutlich erkennbare und intensiv fluoreszierende HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale auf. Teilweise kamen unspezifische grün fluoreszierende, im Vergleich zu den CEP 17-Chromosomensignalen jedoch kleinere Signale vor. Auf die Auswertung einiger Tumorzellkerne musste aufgrund fehlender HER-2/neu-Gensignale, vor allem jedoch fehlender CEP 17-Chromosomensignale verzichtet werden. Bei Fällen mit einer Amplifikation nach Vysis bzw. High-Level-Amplifikation nach Ventana fiel eine Clusterbildung bei sehr dichter Lagerung der HER-2/neu-Gensignale auf. Gesplittete Signale fanden sich vor allem bei den HER-2/neu-Gensignalen. Mittels Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz markierte Epithel- und Tumorzellen zeigten orange fluoreszierende Begrenzungen sowie ein beim Durchfokussieren erkennbares, dem Zytoskelett entsprechendes Netzwerk. In 4 Stanzeln fehlte die Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz, während sie in den verbleibenden 189 Stanzeln (97,9%) mit unterschiedlicher, von schwach bis kräftig reichender Intensität vorhanden war.

4.2.2. HER-2/neu-Status nach Vysis

Für die insgesamt 108 Analysen am Gewebemultiblock wurden in 99 eine Ratio $< 2,0$ und somit keine Amplifikation bestimmt (91,7%) und in 9 eine Ratio $\geq 2,0$ und somit eine Amplifikation errechnet (8,3%). Zwei Stanzeln waren mit einer Ratio von 1,8 (Fall-Nr. 31) und 1,9 (Fall-Nr. 5) als grenzwertig zu betrachten, wurden jedoch als nicht amplifizierte Fälle gewertet.

Von den 17 Versagern an Tumorabklatschpräparaten waren 15 im Gewebemultiblock vertreten. Die Ermittlung des HER-2/neu-Status nach Vysis ergab in diesen 15 Fällen eine Ratio $< 2,0$ und damit keine Amplifikation. In Abbildung 20 (siehe unten) ist die prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio dargestellt.

Aufgrund einer Vierfachbesetzung lag in 7 Fällen eine Doppelbestimmung vor (Fall-Nr. 6, 19, 30, 34, 35, 47 und 49). Dabei waren in 5 Fällen Vysis-Ratio 1 und Vysis-Ratio 2 identisch. Ein Unterschied zwischen Vysis-Ratio 1 und 2 von 0,1 wurde für Fall 30 ermittelt, im Fall 35 betrug die Differenz 0,6.

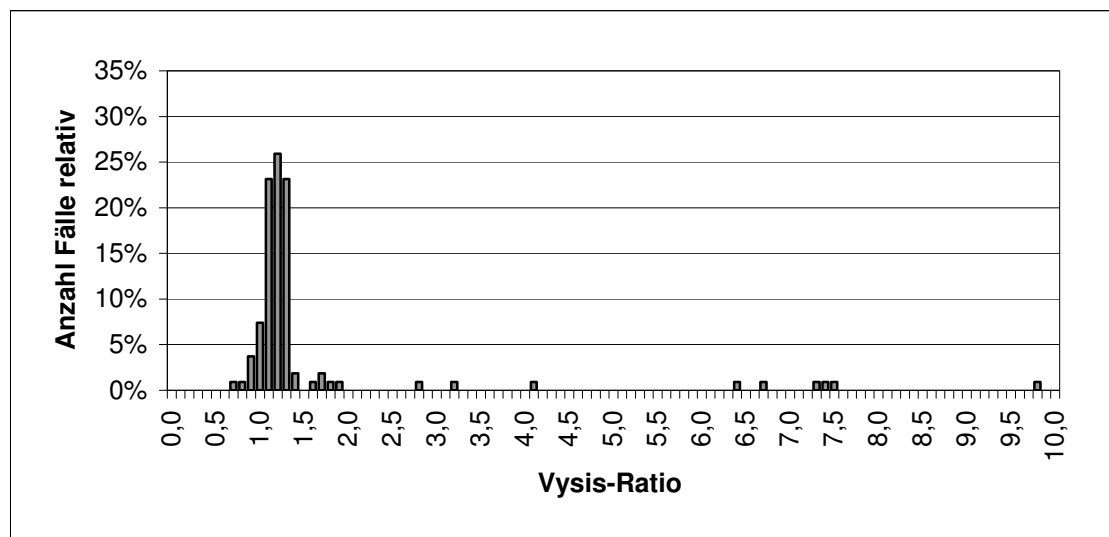


Abb. 20: Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt (n = 108)

4.2.3. Vergleich von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt anhand der Vysis-Ratio

Ein direkter Vergleich mit den an Tumorabklatschpräparaten erhaltenen Ergebnissen war bei 93 Analysen des Gewebemultiblocks möglich. Die Differenz zur Gesamtanalysezahl 108 entsprach 15 Versagern an

Tumorabklatschpräparaten, die zur Untersuchung einer HER-2/neu-Genamplifikation in den Gewebemultiblock aufgenommen wurden.

84 Analysen ohne eine Amplifikation nach Vysis und 8 Analysen mit einer Amplifikation nach Vysis im Gewebemultiblockschnitt stimmten mit den an Tumorabklatschpräparaten ermittelten Ergebnissen überein. Somit beträgt die Konkordanz zwischen Gewebemultiblock und Tumorabklatschpräparaten 98,9%. Unterschiedliche Ergebnisse in der Vysis-Ratio zeigte Fall 121, für den sich am Gewebemultiblockschnitt eine Amplifikation bei fehlender Amplifikation am Tumorabklatschpräparat ergab. Die beiden im Gewebemultiblock als grenzwertig eingestuft Fälle 5 (Ratio 1,9) und 31 (Ratio 1,8) wiesen am jeweiligen Tumorabklatschpräparat eine normale Vysis-Ratio auf. Umgekehrt fand sich für den Grenzfall 35 mit einer am Tumorabklatschpräparat berechneten Ratio von 1,9 am Gewebemultiblockschnitt keine grenzwertige Ratio (1,1 und 1,7) .

Tab. 7: Differenzen in der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (TAP) und am Gewebemultiblockschnitt (TMA) (n = 93)

Differenz Ratio TAP und TMA	Anzahl Analysen	Fall-Nr.	Ratio TAP	Ratio TMA	Bemerkungen TAP	Bemerkungen TMA
0,0	17	-	-	-	-	-
0,1	27	-	-	-	-	-
0,2	22	-	-	-	-	-
0,3	15	-	-	-	-	-
0,4	3	8 33 95	1,0 6,8 1,3	1,4 6,4 1,7	keine Amplifikation Amplifikation keine Amplifikation	keine Amplifikation Amplifikation keine Amplifikation
0,5	1	115	9,3	9,8	Amplifikation	Amplifikation
0,6	1	5	1,3	1,9	keine Amplifikation	keine Amplifikation (grenzwertige Ratio)
0,7	1	38	3,5	2,8	Amplifikation	Amplifikation
0,8	1	35	1,9	1,1	keine Amplifikation (grenzwertige Ratio)	keine Amplifikation
> 1,0	5	53 63 94 101 121	8,6 5,8 4,5 5,0 1,2	7,4 7,3 3,2 6,7 7,5	Amplifikation Amplifikation Amplifikation Amplifikation keine Amplifikation	Amplifikation Amplifikation Amplifikation Amplifikation Amplifikation

Tabelle 7 (siehe Seite 62) gibt die Unterschiede in der Vysis-Ratio von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt für die 93 direkt vergleichbaren Bestimmungen wieder. Bei 81 Analysen (87,1%) betrug die Differenz der am Gewebemultiblockschnitt und an Tumorabklatschpräparaten ermittelten Ratio maximal 0,3. Abweichungen über 0,3 bezogen sich zumeist auf Fälle mit einer grenzwertigen oder einer tatsächlichen Amplifikation (siehe Bemerkungen). So lag bei 4 Fällen mit einer Differenz $> 1,0$ eine Amplifikation vor (Fall-Nr. 53, 63, 94 und 101). Im Fall 121 war der Unterschied auf die diskrepanten Bestimmungen am Gewebemultiblockschnitt mit einer Ratio von 7,5 und am Tumorabklatschpräparat mit einer Ratio von 1,2 zurückzuführen. Bei Betrachtung der Differenzen fiel außerdem auf, dass in 57 der 93 vergleichbaren Analysen (61,3%) die Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt größer als die Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten war, während es sich in 19 Analysen (20,4%) genau umgekehrt verhielt. Bei 17 Ergebnissen (18,3%) wurde eine Übereinstimmung von Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt und Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten erzielt (siehe Gesamtauswertungstabelle im Anhang, Seite 113 bis 119).

Um eine Beziehung zwischen der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt aufzuzeigen, erfolgte eine graphische Darstellung der beiden Größen in einem Streudiagramm (siehe Abbildung 21, Seite 64). Die sich dabei ergebende Punktwolke macht deutlich, dass die Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt mit zunehmender Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten steigt. Mit einer Vysis-Ratio von 1,2 am Tumorabklatschpräparat und einer Vysis-Ratio von 7,5 am Gewebemultiblockschnitt stellt Fall 121 einen Ausreißer dar. Zur Veranschaulichung ist die erste Winkelhalbierende mit der Funktion $y = x$ in das Streudiagramm eingezeichnet. Ein leichtes Masseübergewicht oberhalb der ersten Winkelhalbierenden deutet darauf hin, dass die Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt tendenziell höher ist als die Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten.

Für eine Beurteilung der Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt wurde der Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson errechnet. Aufgrund der 7 Doppelbestimmungen am Gewebemultiblockschnitt ist eine Ermittlung von zwei Korrelationskoeffizienten im günstigen und ungünstigen Fall möglich. Durch Rundung auf zwei Nachkommastellen verliert sich der marginale Unterschied, so dass sich ein gerundeter (einheitlicher) Koeffizient in Höhe von $r = 0,89$ ergibt. Am positiven Betrag des Korrelationskoeffizienten mit einem Wert nahe 1 läßt sich eine Zunahme der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt bei steigender Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten ablesen.

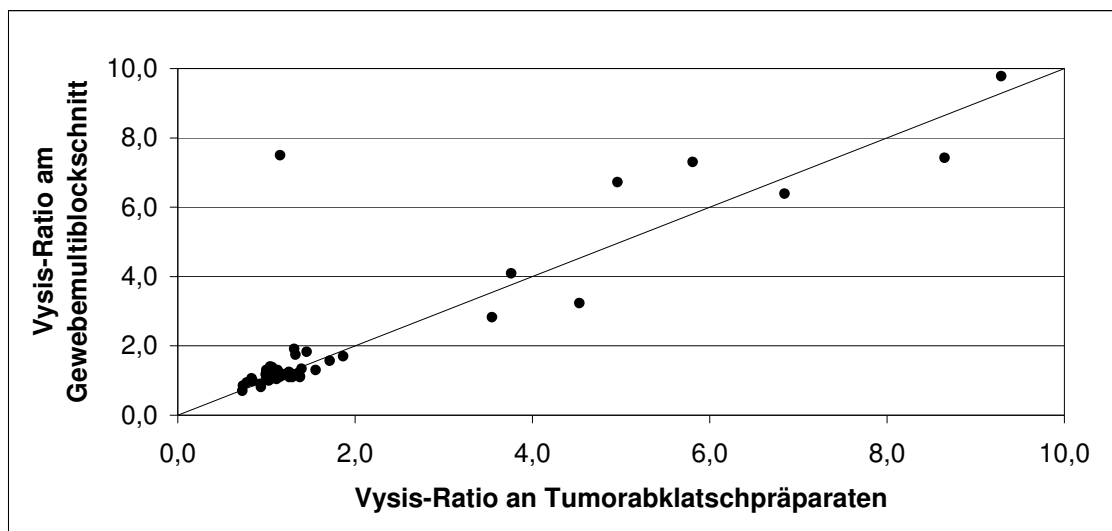


Abb. 21: Beziehung zwischen Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt (n = 93)

4.2.4. HER-2/neu-Status nach Ventana

Anhand der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern fanden sich folgende Ergebnisse: In 98 Analysen lag keine

Amplifikation vor (90,7%). Für 3 Analysen (Fall-Nr. 5, 38 und 94) wurde bei einer durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen größer 4 und kleiner/gleich 10 eine Low-Level-Amplifikation (2,8%) und in 7 Analysen (Fall-Nr. 33, 53, 63, 96, 101, 115 und 121) bei einer durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen größer 10 eine High-Level-Amplifikation bestimmt (6,5%).

Die 15 Versager an Tumorabklatschpräparaten zeigten bei der Einteilung nach Ventana keine Amplifikation am Gewebemultiblockschnitt.

Die prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern gibt Abbildung 22 wieder (siehe unten).

Bei den 7 Doppelbestimmungen (Fall-Nr. 6, 19, 30, 34, 35, 47 und 49) wurde eine maximale Differenz von 0,2 in der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale festgestellt.

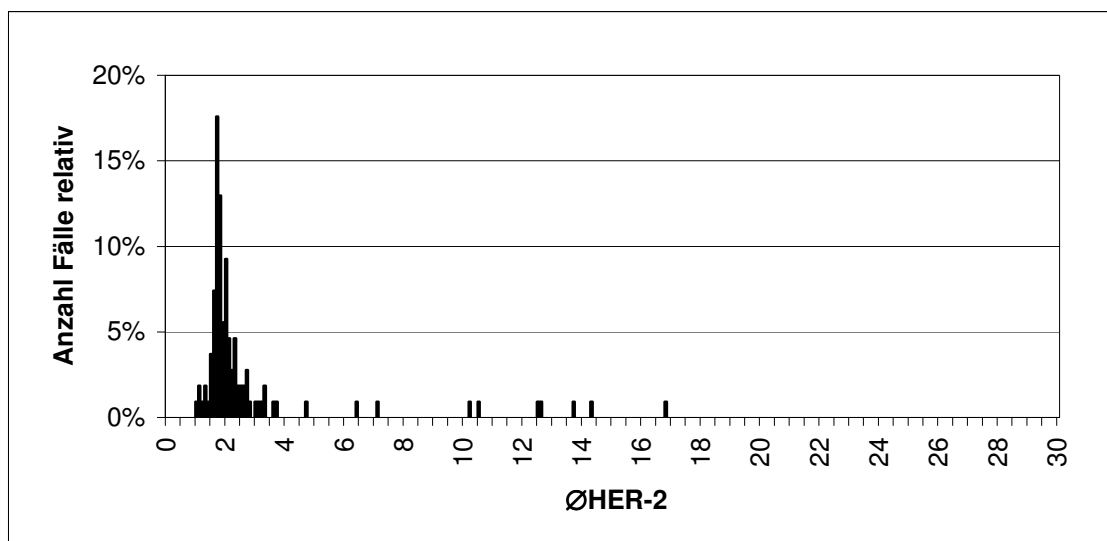


Abb. 22: Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern ($\bar{\text{ØHER-2}}$) am Gewebemultiblockschnitt (n = 108)

Die 98 Analysen ohne eine Amplifikation und 7 Analysen mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana waren identisch mit den nach Vysis nicht amplifizierten und amplifizierten Fällen am Gewebemultiblockschnitt. Das entspricht einer Übereinstimmung von 97,2%.

Hingegen stellten die 3 Analysen mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana eine inhomogene Gruppe dar. Fall-Nr. 5 mit durchschnittlich 4,7 Her-2/neu-Gensignalen wies eine grenzwertige Vysis-Ratio von 1,9 auf, während die nach Vysis amplifizierten Fälle 38 und 94 bei Ventana eine Low-Level-Amplifikation zeigten.

4.2.5. Vergleich von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt anhand der Ventana-Klassifizierung

Bei direkter Gegenüberstellung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern fielen - bis auf 6 Ausnahmen (6,5%) von insgesamt 93 Analysen (Fall-Nr. 51, 95, 98, 115, 121 und 130) - höhere Werte an Tumorabklatschpräparaten als am Gewebemultiblockschnitt auf. Ein identisches Ergebnis wurde in den Fällen 11, 60 und 70 erzielt (siehe Gesamtauswertungstabelle im Anhang, Seite 113 bis 119).

Bei 74 Analysen mit einem negativen HER-2/neu-Status nach Ventana ergab sich eine Übereinstimmung von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt.

Von 8 Fällen mit einer High-Level-Amplifikation an Tumorabklatschpräparaten wiesen 6 identische Ergebnisse am Gewebemultiblockschnitt auf (Fall-Nr. 33, 53, 63, 96, 101, 115). In 2 Fällen mit einer High-Level-Amplifikation an Tumorabklatschpräparaten kam es am Gewebemultiblockschnitt zu einer Verschiebung in Richtung Low-Level-Amplifikation (Fall-Nr. 38 und 94). Der High-Level-Amplifikation am Gewebemultiblockschnitt im Fall 121 stand eine fehlende Amplifikation am Tumorabklatschpräparat gegenüber. Die übrigen Fälle mit einer High-Level-Amplifikation an Tumorabklatschpräparaten waren im Gewebemultiblock nicht vertreten (Fall-Nr. 23, 48, 100, 112, 120, 126).

Während in 10 Fällen an Tumorabklatschpräparaten eine Low-Level-Amplifikation nach Ventana ermittelt wurde, konnte am Gewebemultiblockschnitt lediglich in einem dieser Fälle die Low-Level-Amplifikation bestätigt werden (Fall-Nr. 5). Für die diskrepanten 9 Resultate ergab sich am Gewebemultiblockschnitt keine Amplifikation nach Ventana.

Insgesamt fand sich in 87,1% der Analysen eine Übereinstimmung von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt gemäß der Ventana-Klassifizierung.

4.2.6. Aneuploidie am Gewebemultiblockschnitt

Die Betrachtung der durchschnittlichen Anzahl von CEP 17-Chromosensignalen pro Tumorzellkern, der häufigsten Signalkombinationen und der minimalen und maximalen Werte von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosensignalen führte zu ähnlichen Ergebnissen wie unter 4.1.6. bis 4.1.8. für Tumorabklatschpräparate beschrieben (siehe auch Gesamtauswertungstabelle im Anhang, Seite 113 bis 119).

Fälle mit einer Low-Level- bzw. High-Level-Amplifikation nach Ventana gingen überwiegend mit einer Aneuploidie einher. Im Gegensatz zu den Tumorabklatschpräparaten wurde dabei häufiger das Auftreten einer Monosomie von Chromosom 17 beobachtet. Bei einem Vergleich der Fälle mit einer High-Level-Amplifikation an Tumorabklatschpräparaten und am Gewebemultiblockschnitt anhand der Signalverhältnisse fielen Differenzen bei minimalen und maximalen Werten der HER-2/neu-Gensignale auf. Zum Beispiel wurden in den Fällen 33, 53 und 101 etwa nur halb so viele HER-2/neu-Gensignale am Gewebemultiblockschnitt gezählt. Für die restlichen 3 Fälle (Fall-Nr. 63, 96 und 115) wurden ähnliche minimale und maximale Werte von HER-2/neu-Gensignalen bestimmt.

Durch eine analoge Aufschlüsselung der 98 nach Ventana nicht amplifizierten Analysen am Gewebemultiblockschnitt konnte in 20 Analysen eine normale durchschnittliche Anzahl der CEP 17-Chromosensignale festgestellt werden.

Drei Fälle mit einer Monosomie entsprachen den Ergebnissen an Tumorabklatschpräparaten (Fall-Nr. 32, 44 und 130). In den übrigen Analysen kam es häufiger als an den korrespondierenden Tumorabklatschpräparaten zu einer zahlenmäßigen Verringerung von Chromosom 17. Neben einem normalen Verhältnis von zwei HER-2/neu-Gensignalen und zwei CEP 17-Chromosomensignalen fanden sich zumeist Kombinationen von einem bzw. zwei HER-2/neu-Gensignalen bei einem CEP-17 Chromosomensignal.

4.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Bei 24 der 133 an Tumorabklatschpräparaten ausgewerteten Mammakarzinomfälle waren vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE-) Präparaten durchgeführt worden. Aufgrund einer Doppelbestimmung konnten insgesamt 25 Ergebnisse der konventionellen Paraffinhistologie zur Kontrolle der entsprechenden Resultate an Tumorabklatschpräparaten herangezogen werden.

4.3.1. HER-2/neu-Status nach Vysis an Paraffinschnitten und Vergleich mit Tumorabklatschpräparaten

Durch Berechnung der Vysis-Ratio als Quotient aus der Summe der HER-2/neu-Gensignale und der Summe der CEP 17-Chromosomensignale wurde in 17 Analysen bei einer Ratio $< 2,0$ keine HER-2/neu-Genamplifikation erfasst (68,0%). Aufgrund einer Vysis-Ratio $\geq 2,0$ konnten 8 Ergebnisse mit einer HER-2/neu-Genamplifikation ermittelt werden (32,0%). Eine grenzwertige Vysis-Ratio mit jeweils 1,8 ergab sich in den Fällen 51 und 61.

In Abbildung 23 (siehe Seite 69) ist die prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio an Paraffinschnitten dargestellt.

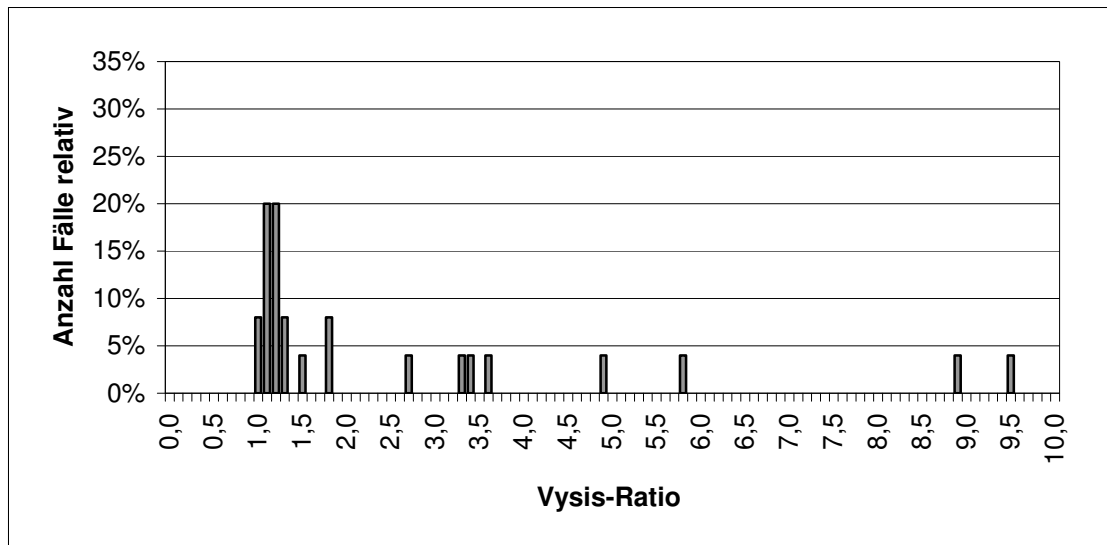


Abb. 23: Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio an Paraffinschnitten (n = 25)

Bei Gegenüberstellung der Vysis-Ratio von Tumorabklatschpräparaten und Paraffinschnitten fand sich sowohl für nicht amplifizierte als auch für amplifizierte Fälle eine vollkommene Übereinstimmung (100%). Die Grenzfälle 51 und 61 an FFPE-Präparaten konnten an Tumorabklatschpräparaten (Vysis-Ratio 1,0 bzw. 1,3) nicht als grenzwertig eingestuft werden.

Die Differenzbeträge zwischen den insgesamt 25 vergleichbaren Vysis-Resultaten sind in Tabelle 8 (siehe Seite 70) aufgeführt. In 16 Analysen (64,0%) betrug die Differenz bis zu 0,3. Eine Differenz von maximal 3,3 zwischen Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und Vysis-Ratio an Paraffinschnitten wurde für die restlichen 9 Analysen bestimmt. Diese großen Unterschiede traten in Fällen mit einer HER-2/neu-Genamplifikation auf (Fall-Nr. 94 und 112).

Tab. 8: Differenzen in der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (TAP) und an Paraffinschnitten (FFPE) (n = 25)

Differenz Ratio TAP und FFPE	Anzahl Analysen	Fall-Nr.	Ratio TAP	Ratio FFPE	Bemerkungen TAP	Bemerkungen FFPE
0,0	4	-	-	-	-	-
0,1	6	-	-	-	-	-
0,2	4	-	-	-	-	-
0,3	2	-	-	-	-	-
0,4	1	62	1,1	1,5	keine Amplifikation	keine Amplifikation
0,5	2	23 61	3,1 1,3	3,6 1,8	Amplifikation keine Amplifikation	Amplifikation keine Amplifikation
0,8	1	51	1,0	1,8	keine Amplifikation	keine Amplifikation
0,9	2	48 63	6,7 5,8	5,8 4,9	Amplifikation Amplifikation	Amplifikation Amplifikation
> 1,0	3	94 94 112	4,5 4,5 5,6	2,7 3,4 8,9	Amplifikation Amplifikation Amplifikation	Amplifikation Amplifikation Amplifikation

Von einer grafischen Darstellung und einer Berechnung der Stärke des linearen Zusammenhangs der Vysis-Ergebnisse an Tumorabklatschpräparaten und Paraffinschnitten wurde abgesehen. Grund dafür war die geringe Fallzahl von 25 vergleichbaren Präparaten, die statistisch gesehen keine große Aussagekraft besitzt.

4.3.2. HER-2/neu-Status nach Ventana an Paraffinschnitten und Vergleich mit Tumorabklatschpräparaten

Anhand der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern wurden bei insgesamt 25 Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Präparaten in 15 Analysen keine HER-2/neu-Amplifikation (60,0%), in 5 eine Low-Level-Amplifikation (20,0%) und in weiteren 5 eine High-Level-Amplifikation nach Ventana festgestellt (20,0%).

Die prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern (\emptyset HER-2) an Paraffinschnitten ist in Abbildung 24 wiedergegeben (siehe Seite 71).

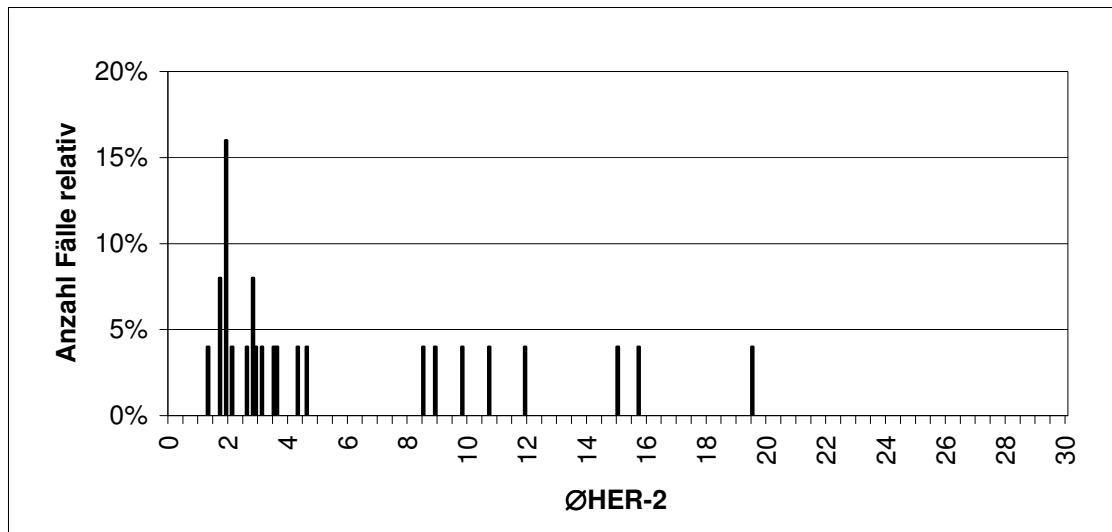


Abb. 24: Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Signalen pro Tumorzellkern (\bar{X} HER-2) an Paraffinschnitten (n = 25)

Beim Vergleich dieser Resultate mit den entsprechenden Ergebnissen an Tumorabklatschpräparaten war bei 13 Fällen sowohl am histologischen als auch am zytologischen Material keine Amplifikation nach Ventana zu erkennen. Unterschiede kamen bei Fällen mit einer Low-Level- und High-Level-Amplifikation nach Ventana vor. Lediglich Fall 62 zeigte am Tumorabklatschpräparat und am Paraffinschnitt gleichermaßen eine Low-Level-Amplifikation. Während in den Fällen 128 und 129 die am Tumorabklatschpräparat ermittelte Low-Level-Amplifikation am Paraffinschnitt nicht nachgewiesen werden konnte, verhielt es sich im Fall 71 genau umgekehrt.

Die bei 7 Tumorabklatschpräparaten vorliegende High-Level-Amplifikation wurde in 5 Paraffinschnitten bestätigt (Fall-Nr. 23, 48, 63, 112 und 115). Im Gegensatz zu den Tumorabklatschpräparaten mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana wiesen die Paraffinschnitte in den Fällen 94 (Doppelbestimmung) und 120 eine Low-Level-Amplifikation auf.

Die Übereinstimmung von Tumorabklatschpräparaten und konventionellen Paraffinschnitten gemäß der Ventana-Klassifizierung betrug somit 76,0%.

5. Diskussion

Durch Integration von Trastuzumab (Herceptin®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) in die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms ist erstmals eine deutliche Verlängerung von rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben beim metastasierten Mammakarzinom mit positivem HER-2/neu-Status möglich (Baselga et al. 1996, Cobleigh et al. 1999, Slamon et al. 2001). Unter Trastuzumab-Monotherapie fanden Cobleigh et al. (1999) beim vorbehandelten metastasierten HER-2/neu-positiven Mammakarzinom eine Gesamtansprechrate von 15% mit einer mittleren Remissionsdauer von 9,1 Monaten (Phase II-Studie, H0649g).

Als rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper erkennt Trastuzumab hochspezifisch sein Antigen, den HER-2/neu-Rezeptor, und blockiert dessen extrazelluläre Domäne. Auf diese Weise kommt es zur Proliferationshemmung HER-2/neu-überexprimierender Tumorzellen (Baselga et al. 2001, McKeage and Perry, 2002). Der therapeutische Einsatz von Trastuzumab setzt die Selektion von Mammakarzinomen mit einem positiven HER-2/neu-Status voraus (HER-2/neu-Rezeptorüberexpression und/oder HER-2/neu-Genamplifikation), die auf eine Behandlung mit Trastuzumab ansprechen.

Damit stellt sich einerseits die Frage nach einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung des HER-2/neu-Status, andererseits die Frage nach einem geeigneten Untersuchungsmaterial. Beide Fragen sind Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Dabei sollte festgestellt werden, ob durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit (Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA) an 150 Tumorabklatschpräparaten von histologisch gesicherten Mammakarzinomen der Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation erbracht werden kann. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich mit dieser Technik im Vergleich zu konventionellen Paraffinschnitten und einem Gewebemultiblockschnitt repräsentative Ergebnisse mit eventuellen diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen erzielen lassen.

Die Kombination von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Tumorabklatschpräparaten kann dabei zu einer exakteren quantitativen Signalerfassung am zytologischen Material führen. Bei Verwendung des doppelmarkierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits ist zusätzlich eine Differenzierung von Amplifikation und Polysomie von Chromosom 17 möglich. Auf die Bedeutung dieser beiden Gesichtspunkte wird im Folgenden eingegangen.

5.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten

Der für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE)-Präparate optimierte PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit musste zunächst an Tumorabklatschpräparate adaptiert werden.

5.1.1. Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten und deren Vor-und Nachteile

Für die Anpassung der FISH-Technik an Tumorabklatschpräparate waren Aspekte wie Rationalisierung, Optimierung und Qualität vorrangig.

Die schnelle Herstellung der Tumorabklatschpräparate durch mehrmaliges leichtes Aufdrücken des Tumorgewebes auf Superfrost®-Adhäsiv Objektträger und ein rasches Spray-Verfahren mit zuverlässiger Fixierung der Präparate (Merckofix®-Fixationsspray) ermöglichten eine deutliche Zeitersparnis im Vergleich zur Paraffinhistologie (siehe Tabelle 2, Seiten 42 und 43). Wegfall von Entparaffinierung und Proteasebehandlung sowie automatisch ablaufende Denaturierung und Hybridisierung im HyBrite™-System führten bei den Tumorabklatschpräparaten zu weiterer Rationalisierung und zeitlicher Straffung. Durch eine geeignete Kombination der Salzkonzentrationen für die Posthybridisierungs- bzw. Stringenzwaschung gelang es, inkomplett gebundene

und unspezifische Sonde bei erhaltener Signalintensität praktisch vollständig zu entfernen.

Die Anfertigung von Paraffinblöcken bedeutet jedoch eine einfachere Asservierung und erlaubt zahlreiche Zusatz- und Folgeuntersuchungen. Für die vorliegende Dissertation wurden von jedem Mammakarzinom 4 bis 6 Tumorabklatschpräparate erstellt, wodurch die Anzahl weiterer Untersuchungen eingeschränkt ist. Es besteht allerdings die Möglichkeit, durch Waschen und Umfärben identische Tumorabklatschpräparate mehrfach zu verwenden.

An Tabelle 2 (siehe Seiten 42 und 43) fällt außerdem der unterschiedliche Verbrauch von Sondenmaterial und DAPI für die Zellkern-Gegenfärbung auf. Während an Tumorabklatschpräparaten die herstellerseits angegebenen Mengen mit 10 µl Sonden-Kit und 10 µl DAPI eingehalten wurden, war die Paraffinhistologie deutlich sparsamer und damit auch wesentlich preisgünstiger. Basierend auf bisher unveröffentlichten Ergebnissen vorausgegangener Testserien des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen (Vogel) wurden pro Paraffinschnitt lediglich 1 µl Sonde und 1,5 µl DAPI und pro Gewebemultiblockschnitt mit 256 Analysen nur 16 µl Sonde und 20 µl DAPI verbraucht. Aufgrund der dichteren Lagerung von Tumorzellen in der Paraffinhistologie sind Materialmengen in dieser Größenordnung für eine qualitativ einwandfreie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ausreichend. Eine ähnliche Material- und Kosteneinsparung wäre nach entsprechender Austestung jedoch auch für Tumorabklatschpräparate denkbar.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem modifizierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit konnte somit an Tumorabklatschpräparaten etabliert werden.

5.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Tumorabklatschpräparate

Wie erwartet waren die Tumorzellkerne vollständig und lagen meist einzeln oder in kleinen Gruppen. Da nur teilweise Zellkernüberlappungen auftraten,

konnten praktisch alle Tumorzellkerne für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung herangezogen werden. Bis auf eine Ausnahme (Fall-Nr. 100, 29 Tumorzellkerne, Vysis-Ratio 6,3) wurden stets die erforderlichen 60 Tumorzellkerne ausgezählt. Eine Auswertung von 20 Tumorzellkernen zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation hielten Persons et al. (2000) für ausreichend. Herzog (Med. Dissertation in Vorbereitung) konnte zeigen, dass lediglich bei Fällen mit einer Vysis-Ratio von 1,6 bis 2,4 (Quotient aus durchschnittlicher Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen bei 60 Tumorzellkernen) eine Auszählung von mindestens 60 Tumorzellkernen notwendig ist. Nahezu identische Grenzwerte mit 1,5 bis 2,5 gibt Gaedcke an (Med. Dissertation in Vorbereitung). In diesem Bereich kann eine HER-2/neu-Genamplifikation aufgrund auszählungsbedingter Schwankungen in der Vysis-Ratio übersehen werden.

Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale ist im Wesentlichen von der Hintergrundbeschaffenheit abhängig. Wegen eines starken Hintergrunds aus zytoplasmatischem und erythrozytärem Detritus und teilweise unspezifischen fluoreszierenden Partikeln konnten 17 Tumorabklatschpräparate (11,3%) auch nach Wiederholung mit neuen Präparaten, frischen Kit-Chargen und unterschiedlichen Analysengängen nicht ausgewertet werden. Bei guter Beurteilbarkeit der in diesen Analysenläufen mitgefärbten Tumorabklatschpräparate handelt es sich ursächlich wohl nicht um einen methodischen Fehler der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, sondern eher um ein technisches Problem bei der Herstellung der Tumorabklatschpräparate. Diese Annahme wird auch dadurch bekräftigt, dass 15 Versager bei Überprüfung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Gewebemultiblockschnitt auswertbar waren. Probleme bei der Herstellung von Tumorabklatschpräparaten können aus einer zu feuchten Schnittfläche des Tumorgewebes resultieren, die zu einer vermehrten Ablagerung von Proteinen mit dadurch erhöhter unspezifischer Fluoreszenz führt. Ferner fördert eine langsame Abtrocknung autolytische Prozesse. Auch Szöllösi et al. (1995) beobachteten bei luftgetrockneten Tumorabklatschpräparaten eine verstärkte Autofluoreszenz.

Das Vorkommen nicht verwertbarer FISH-Analysen in verschiedenen Veröffentlichungen deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation. Jacobs et al. (1999) beschrieben bei 100 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit dem Inform®-HER-2/neu-Kit von Ventana an FFPE-Präparaten von Mammakarzinomen auch nach Wiederholung 7% Ausfälle vor allem wegen unspezifischer Signale im Hintergrund. Ebenfalls 7% Ausfälle verzeichneten Lebeau et al. (2001a) bei Verwendung des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits an Paraffinschnitten von Mammakarzinomen. Bei Sauter et al. (1993) waren 83,4% FISH-Analysen an Tumorabklatschpräparaten von Blasenkarzinomen auswertbar. Im Protokoll des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits (2001) wird von 48 Versagern bei 572 FISH-Untersuchungen an FFPE-Präparaten von Mammakarzinomen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit berichtet (8,4%). Aus dieser Datenlage und qualitativ guten Ergebnissen in 88,7% der untersuchten Tumorabklatschpräparate bestätigt sich erneut die Anwendbarkeit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem modifizierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten.

5.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an der Paraffinhistologie

Validierung und Interpretation der an Tumorabklatschpräparaten erzielten Resultate erfolgten im direkten Vergleich an einem Gewebemultiblockschnitt mit Doppelfärbung aus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz und 25 FISH-Analysen an konventionellen Paraffinschnitten des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen.

5.2.1. Herstellung und Doppelmarkierung des Gewebemultiblockschnitts

Für die vorliegende Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen ein Gewebemultiblock mit insgesamt 256 Gewebestanzylindern angefertigt. Dabei wurden Stanzen aus den Paraffin-

blöcken derjenigen Mammakarzinome entnommen, die zuvor als Tumorabklatschpräparate untersucht wurden.

Die Herstellung eines Gewebemultiblocks ist ein arbeits- und zeitintensiver Prozess. Durch den Einsatz eines Präzisionsgeräts (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) ist jedoch eine gleichzeitige Anfertigung mehrerer Gewebemultiblocke möglich (Mirlacher und Storz 2000). Da ein solches sehr teures Präzisionsgerät nicht zur Verfügung stand, wurde der Gewebemultiblock der vorliegenden Dissertation mit einem speziellen, am Institut für Pathologie der Universität Tübingen entwickelten manuellen Verfahren hergestellt (Vogel, siehe 3.2.5., Seite 35). Um den zeitlichen Aufwand trotzdem zu begrenzen, wurde im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen (Kallioniemi et al. 2001, Kononen et al. 1998, Schraml et al. 1999) auf eine zusätzliche Absicherung über den Hämalaun-Eosin-(HE)-Schnitt bei Entnahme der Gewebestanzylinder verzichtet. Eventuellen, dadurch bedingten Ausfällen sollte jedoch durch Doppel- und teilweise auch Vierfachbesetzung in korrespondierenden Positionen von Gewebemultiblock-Hälfte 1 und 2 entgegengewirkt werden (siehe 5.2.2., Seite 78).

Durch Verwendung einer Gewebestanze mit einem Innendurchmesser von üblicherweise 0,6 mm werden die Donorblöcke nur minimal beschädigt. Eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Auswertung von FISH-Analysen ist aber an einem solchen Gewebefragment bei morphologisch und biologisch heterogenem Tumor eingeschränkt (Kallioniemi et al. 2001, Kononen et al. 1998, Mirlacher und Storz 2000, Schraml et al. 1999). Aus diesem Grund war der in der vorliegenden Dissertation gewählte Innendurchmesser der Gewebestanze von 1 mm sinnvoller (siehe 5.3.1, Seite 83).

Der entscheidende Vorteil des Gewebemultiblocks liegt allerdings in der kostengünstigen Durchführung und schnellen Beurteilbarkeit einer Vielzahl von unterschiedlichen Gewebeproben. Im Vergleich zu 256 einzelnen Objektträgern konnten an einem einzigen Schnitt des Gewebemultiblocks gleichzeitig 256 verschiedene Gewebeproben mit immenser Material- und Kosteneinsparung gefärbt und mit einer deutlichen Zeitersparnis fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Außerdem lassen sich bei einer durchschnittlichen

Schnittdicke von 4 bis 8 µm von einem solchen Gewebemultiblock mindestens 200 Schnitte anfertigen. An praktisch identischem Tumormaterial kann eine Vielzahl von Untersuchungen auf DNA-, RNA- oder Proteinebene parallel vorgenommen und verglichen werden (Kallioniemi et al. 2001, Kononen et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem Schnitt des Gewebemultiblocks gleichzeitig eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit und eine Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz zur besseren Abgrenzung des Tumors vom umgebenden Gewebe durchgeführt.

5.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Gewebemultiblock-schnitts

Im Gegensatz zu den Tumorabklatschpräparaten lagen die Tumorzellen im Gewebemultiblockschnitt dicht beieinander (siehe Abbildungen 11 bis 16, Seiten 48 bis 50). Dabei kam es häufiger zu Zellkernüberlappungen, so dass eine Auswertung dieser Tumorzellkerne nicht möglich war. Wie an den Tumorabklatschpräparaten konnten auch hier nur in einem Fall nicht die geforderten 60 Tumorzellkerne ausgezählt werden (Fall-Nr. 107, 37 Tumorzellkerne, Vysis-Ratio 1,1), während in allen anderen Stanzten bei einem Durchmesser von 1 mm ausreichend Tumorzellen vorhanden waren.

Die Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz war in 97,9% erfolgreich und hatte trotz gleichzeitiger Anfärbung von normalen Epithelzellen entscheidende Bedeutung bei der Identifizierung von Tumorzellen. Bei fehlender Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz (2,1%) konnte das Vorhandensein von Tumorgewebe über Morphologie und Wachstumsmuster sichergestellt werden. In wenigen Fällen hatten eine starke Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz oder Überlagerungen der Zellkerne durch Zytoplasma ein erschwertes Erkennen von HER-2/neu-Genignalen zur Folge. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung und sichere Beurteilung einer HER-2/neu-Genamplifikation waren jedoch immer möglich. Insgesamt erwies sich die Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz als äußerst sinnvoll,

so dass sich die berechtigte Frage stellt, warum ein entsprechender Kit nicht von den Firmen angeboten wird.

Bei 63 von insgesamt 256 Analysen im Gewebemultiblock waren ursächlich verschiedene Ausfälle zu verzeichnen: 32 Stenzen enthielten kein Tumorgewebe, bei 19 kam es zu einem kompletten Abschwimmen des Gewebes, 4 waren zerrissen und 8 Stenzen wiesen eine zu geringe Signalintensität auf. Aufgrund der Doppel- und Vierfachbesetzungen entsprachen diese Verluste lediglich 16 Fällen (13,7%).

Abschwimmen und Zerreißen von Tumorgewebe hätten durch ein spezielles Schneideverfahren minimiert werden können. An einer selbstklebenden Folie haftet der Gewebemultiblockschnitt, wird so auf einen Objektträger aufgebracht und durch Bestrahlen mit UV-Licht für ca. 30 sec mit diesem vernetzt (adhesive-coated tape sectioning system, Instrumedics, Inc., Hackensack, NJ, USA). Schraml et al. (1999) beschrieben trotz Kontrolle über den HE-Schnitt und Einsatz dieses Schneideverfahrens 62 Verluste (15,6%) bei insgesamt 397 FISH-Analysen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an einem Gewebemultiblockschnitt mit verschiedenen Tumoren. Auch hier fehlten zum Beispiel 15 Stenzen und 22 Stenzen waren ohne Tumorgehalt. Aus diesen Angaben wird die Bedeutung von Doppel- und Vierfachbesetzung zur Reduzierung von Ausfällen ersichtlich.

Nach Erfahrungen von Mirlacher und Storz (2000) sind 70% bis 90% der Stenzen eines Gewebemultiblockschnitts informativ. Obwohl bei der Herstellung des vorliegenden Gewebemultiblocks auf ein Präzisionsgerät und das oben beschriebene Schneideverfahren verzichtet werden musste und keine zusätzliche Absicherung über den HE-Schnitt erfolgte, konnten insgesamt 86,3% der Fälle ausgewertet werden. Im Vergleich zur genannten Literaturangabe wurde am vorliegenden Gewebemultiblockschnitt somit ein sehr gutes Ergebnis erzielt.

5.3. Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation an Tumorabklatschpräparaten im Vergleich zur Paraffinhistologie

Eine endgültige Qualitätsbeurteilung der modifizierten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten ist erst dann möglich, wenn sich mit diesem Verfahren zuverlässig der HER-2/neu-Status bestimmen läßt und im Vergleich zur Paraffinhistologie bestätigt wird.

Für eine optimale Bestimmung der HER-2/neu-Genamplifikation wurden zwei unterschiedliche Bewertungsmaßstäbe verwendet.

Einerseits wurde dem Protokoll des PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits zufolge die Vysis-Ratio errechnet. Sie ist definiert als der Quotient aus der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosensignalen bei 60 Tumorzellkernen. Mammakarzinome mit einer Vysis-Ratio $\geq 2,0$ weisen eine HER-2/neu-Genamplifikation auf, bei einer Vysis-Ratio $< 2,0$ liegt keine Amplifikation vor. Ergebnisse zwischen 1,8 und 2,2 sind als grenzwertig zu betrachten.

Andererseits wurde in Anlehnung an das Protokoll des Inform®-HER-2/neu-Kits (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) und den zweiten Expertenworkshop zu „Neuen Entwicklungen bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms“ von 1999 (Kaufmann und Kanz 2000) eine Einteilung anhand der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale vorgenommen (Klassifizierung nach Ventana, siehe 3.2.2., Seite 30). Werte kleiner/gleich 4,0 gelten als nicht amplifiziert, Werte größer 4,0 und kleiner/gleich 10,0 als niedrig amplifiziert (Low-Level-Amplifikation/LLA) und Werte größer 10,0 als hoch amplifiziert (High-Level-Amplifikation/HLA).

5.3.1. Ermittlung des HER-2/neu-Status nach Vysis

Bei den 133 auswertbaren Tumorabklatschpräparaten konnte anhand der Vysis-Ratio in 119 Fällen keine Amplifikation ermittelt werden (89,5%). Eine

Amplifikation wurde in 14 Fällen festgestellt (10,5%). In der Paraffinhistologie wurde eine Amplifikation in 8,3% am Gewebemultiblock errechnet, während an konventionellen Paraffinschnitten 32,0% amplifiziert waren. Das stark abweichende Ergebnis an Paraffinschnitten des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen läßt sich durch eine Vorselektion des an sich gleichen Patientenkollektivs erklären. In 15 der insgesamt 24 Fälle waren FISH-Analysen als Kontrolle bzw. Bestätigung von immunhistochemischen Untersuchungen mit einem HercepTest®-Score von 2+ bzw. 3+ durchgeführt worden. Daraus wird ersichtlich, in welchem Maße der prozentuale Anteil nachgewiesener Amplifikationen allein von der Zusammensetzung des Patientenkollektivs beeinflusst wird.

Nach einer Übersichtsarbeit von Révillion et al. (1998) kamen HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression in durchschnittlich 26% der Mammakarzinome bei einer Streubreite von 5% bis 55% vor. Mit 10,5% an Tumorabklatschpräparaten bzw. 8,3% am Gewebemultiblockschnitt lag der prozentuale Anteil der amplifizierten Mammakarzinome deutlich niedriger, jedoch innerhalb der angegebenen Streubreite.

Die Übereinstimmung von nicht amplifizierten und amplifizierten Fällen an Tumorabklatschpräparaten mit dem Gewebemultiblockschnitt betrug bei 93 vergleichbaren Analysen 98,9%. Einziger Ausreißer war der Fall 121 mit nachgewiesener Amplifikation am Gewebemultiblockschnitt bei fehlender Amplifikation am Tumorabklatschpräparat. Nach Überprüfung konnte für diese Diskrepanz eine Fehlbesetzung beider Stenzen im Gewebemultiblock sicher verantwortlich gemacht werden. In der weiteren Diskussion bleibt Fall 121 daher unberücksichtigt.

Beim Vergleich von nicht amplifizierten und amplifizierten Fällen an Tumorabklatschpräparaten und an herkömmlichen Paraffinschnitten fanden sich in 100% identische Ergebnisse.

Durch Berechnung der Differenzbeträge der Vysis-Ratio von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt bzw. konventionellen

Paraffinschnitten ergab sich in 87,1% bzw. 64,0% ein Unterschied von maximal 0,3 (siehe Tabelle 7, Seite 62 und Tabelle 8, Seite 70).

Differenzen über 0,3 bezogen sich an allen drei Untersuchungsmaterialien vor allem auf amplifizierte Fälle. Wegen einer dichten Lagerung der HER-2/neu-Gensignale in Haufen, sogenannten Clustern, war eine exakte quantitative Signalerfassung bei Vorliegen einer HER-2/neu-Genamplifikation nicht möglich. Auch Hirashima et al. (2001), Lebeau et al. (2001a) und Pauletti et al. (2000) bestätigten, dass aufgrund einer Clusterbildung in amplifizierten Fällen keine genaue Auszählung der HER-2/neu-Gensignale vorgenommen werden kann. Bei wiederholter Auswertung eines Präparats sowohl durch ein- und denselben Untersucher (Intraobservervariabilität) als auch durch verschiedene Untersucher (Interobservervariabilität) sind insbesondere bei einer High-Level-Amplifikation größere Abweichungen in der Vysis-Ratio nicht auszuschließen (Gaedcke, Med. Dissertation in Vorbereitung). In der vergleichsweise schlechteren Übereinstimmung zwischen Tumorabklatschpräparaten und konventionellen Paraffinschnitten von 64,0% spiegelt sich der hohe Anteil HER-2/neu-positiver Mammakarzinome mit größeren Differenzen durch Clusterbildung wider.

Die Beurteilung von gesplitteten Signalen, die fast ausschließlich und relativ häufig bei HER-2/neu-Gensignalen auftreten, könnte ebenfalls zu Diskrepanzen bei der Signalerfassung geführt haben. Beträgt der Abstand zweier Signale gleicher Fluoreszenz, Intensität und Größe weniger als der Durchmesser eines dieser Signale, liegt ein gesplittetes Signal vor. Dieses wird nach Abbott/Vysis als ein Einzel-Signal gewertet (siehe Abbildung 8, Seite 29). Abhängig von der absoluten Anzahl solcher gesplitteter Signale und der subjektiven Beurteilung des jeweiligen Untersuchers, zwei Signalpunkte als ein gesplittetes Signal anzusehen, können sich jedoch Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale mit Auswirkung auf die Vysis-Ratio ergeben. In der vorliegenden Dissertation wurde die oben genannte Regel an allen drei Untersuchungsmaterialien gleichermaßen eingehalten, wobei die Entscheidung im Einzelfall oftmals nicht leicht war.

Als weitere Ursache für die Diskrepanz von 0,6 zwischen Vysis-Ratio 1 und 2 bei einer Doppelbestimmung innerhalb des Gewebemultiblocks (Fall-Nr. 35) kann die bereits erwähnte Tumorerogenität genannt werden. Auch Kallioniemi et al. (1992) fanden große Unterschiede in der Anzahl der HER/2-neu-Gensignale zwischen den einzelnen Tumorzellen insbesondere von amplifizierten Mammakarzinomen und führten diese Beobachtung auf eine Heterogenität innerhalb dieser Mammakarzinome zurück. Identische Resultate in 5 weiteren der insgesamt 7 Doppelbestimmungen lassen trotzdem den gewählten größeren Innendurchmesser der Gewebestanze von 1 mm sinnvoll erscheinen. Darüberhinaus weisen diese Übereinstimmungen auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am vorliegenden Gewebemultiblockschnitt hin.

Für die einzelnen Beträge der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und am Gewebemultiblockschnitt wurde ein Produktmoment-Korrelationskoeffizient nach Pearson von $r = 0,89$ berechnet. Damit ergibt sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt. In amplifizierten Fällen war die Stärke des linearen Zusammenhangs aufgrund der beschriebenen Clusterbildung weniger ausgeprägt. Abbildung 21 (Seite 64) ist zu entnehmen, dass die Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt bei steigender Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten etwas stärker zunimmt.

Auf diese Beobachtung wird in 5.3.2. in größerem Zusammenhang eingegangen.

Als Zwischenergebnis kann festgehalten werden: Der HER-2/neu-Status wird durch die modifizierte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten zuverlässig bestimmt. Im Vergleich zur Paraffinhistologie betrug die Übereinstimmung von nach Vysis amplifizierten und nicht amplifizierten Fällen nahezu 100%.

5.3.2. Ermittlung des HER-2/neu-Status nach Ventana

Unter Berücksichtigung der Ventana-Klassifizierung waren an 107 Tumorabklatschpräparaten keine Amplifikationen nachweisbar (80,5%). Diese Ergebnisse waren identisch mit den nach Vysis nicht amplifizierten Fällen. Alle 14 durch die Vysis-Ratio erfassten HER-2/neu-positiven Resultate gingen mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana einher (10,5%). Somit ergab sich in 91,0% eine Übereinstimmung von Vysis-Ratio und Ventana-Klassifizierung an Tumorabklatschpräparaten. Hingegen waren 12 Fälle mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana (9,0%) durch die Vysis-Ratio als nicht amplifiziert eingestuft worden.

In einem Nebenaspekt läßt sich an diesen Resultaten der Einfluß unterschiedlicher Bewertungsmaßstäbe bei gleicher Methode, gleichem Untersuchungsmaterial und Patientenkollektiv auf den Prozentsatz nachgewiesener Amplifikationen aufzeigen: Nach Vysis lag eine Amplifikation in 10,5% der Tumorabklatschpräparate vor, während nach Ventana 19,5% der Fälle amplifiziert waren.

Am Gewebemultiblockschnitt fanden sich bei 98 nicht amplifizierten Fällen keine Differenzen zwischen beiden Bewertungsmaßstäben (90,7%). Der positive HER-2/neu-Status nach Vysis entsprach bei 6 Mammakarzinomen einer High-Level-Amplifikation (5,6%) und bei 2 Mammakarzinomen einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana (1,9%). Zusätzlich wies ein weiterer Fall (Fall-Nr. 5) eine Low-Level-Amplifikation auf (0,9%). Identische Ergebnisse von Vysis-Ratio und Ventana-Klassifizierung konnten also in 96,3% am Gewebemultiblockschnitt festgestellt werden (unter Ausschluss von Fall 121).

In der Literatur gibt es nur wenige Veröffentlichungen mit gleichzeitiger Verwendung und Gegenüberstellung beider Bewertungsmaßstäbe. Wie in der vorliegenden Dissertation ermittelten Wang et al. (2002) sowohl die Vysis-Ratio als auch die durchschnittliche Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern bei FISH-Analysen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Paraffinschnitten von Mammakarzinomen. Dabei wurde jedoch nicht zwischen einer Low-Level- und einer High-Level-Amplifikation differenziert, sondern in

Anlehnung an das Protokoll des Inform®-HER-2/neu-Kits ein Grenzwert von größer/gleich 4,0 zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation festgelegt. Diskrepanzen beim Vergleich dieser beiden Bewertungsmaßstäbe fanden sich in 6,3% der FISH-Analysen von Wang et al. (2002) gegenüber 9,0% an Tumorabklatschpräparaten dieser Arbeit. Zum Nachweis einer HER-2/neu-Genamplifikation kombinierten Lebeau et al. (2001a) und Pauletti et al. (1996) die Protokolle von Inform®-HER-2/neu-Kit und PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit. FISH-Untersuchungen mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit bei Mammakarzinomen wurden zunächst nach dem Protokoll des Inform®-HER-2/neu-Kits eingestuft. In Fällen mit einer durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen größer 4,0 wurden zusätzlich die CEP 17-Chromosomensignale ausgezählt und die Vysis-Ratio gebildet. Betrug die Vysis-Ratio mehr als zwei, konnte eine Vermehrung der HER-2/neu-Gensignale durch alleinige Polysomie von Chromosom 17 ausgeschlossen werden. Bei diesen sogenannten Polysomie-korrigierten Amplifikationen wurde zusätzlich zwischen niedrig und hoch amplifizierten Fällen unterschieden.

Wang et al. (2002) machten jedoch darauf aufmerksam, dass für die Differenzen zwischen den beiden Bewertungsmaßstäben möglicherweise unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen Sonden verantwortlich sind. Das würde bedeuten, dass die HER-2/neu-Gensonden des PathVysion™ HER-2 DNA-Sonden-Kits und des Inform®-HER-2/neu-Kits bei zum Beispiel unterschiedlicher Struktur und unterschiedlichen Temperaturoptima nicht denselben Hybridisierungserfolg aufweisen. Je nach verwendetem Testverfahren könnten daraus differierende Werte von HER-2/neu-Gensignalen bei der fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung identischer Mammakarzinome resultieren. Die Folge wären diskrepante Ergebnisse von PathVysion™ HER-2 DNA-Sonden-Kit und Inform®-HER-2/neu-Kit hinsichtlich des HER-2/neu-Status. In der vorliegenden Dissertation sollte gerade die Anwendung von Vysis-Ratio und Ventana-Klassifizierung definitive Aussagen zum HER-2/neu-Status im Hinblick auf eine Trastuzumab-Therapie ermöglichen. Jedoch wurden die 12 nach der Ventana-Klassifizierung niedrig amplifizierten Fälle an Tumorabklatschpräparaten bis auf einen Grenzfall nicht durch die Vysis-Ratio erfasst. Die

Vysis-Ratio scheint grenzwertige HER-2/neu-Genamplifikationen zu übersehen, die hingegen durch die Ventana-Klassifizierung aufgedeckt werden. In solchen Fällen dürfte die Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit Trastuzumab schwer fallen. Da sowohl der PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit als auch der Inform®-HER-2/neu-Kit von der FDA zur Bestimmung des HER-2/neu-Status beim Mammakarzinom zugelassen sind (Rampaul et al. 2002), müsste in weiteren Studien untersucht werden, inwieweit die beiden Testverfahren bei identischen Mammakarzinomen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und die Diskrepanzen der vorliegenden Dissertation bestätigt werden.

Beim Vergleich der Resultate nach Ventana von Tumorabklatschpräparaten und Gewebemultiblockschnitt wiesen 12,9% Diskrepanzen auf. Vor allem bei Fällen mit einer Low-Level- bzw. High-Level-Amplifikation kam es zu Abweichungen. Von 12 niedrig amplifizierten Fällen an Tumorabklatschpräparaten waren 10 im Gewebemultiblock vertreten, wobei lediglich in einem Fall die Low-Level-Amplifikation bestätigt werden konnte. In 6 der insgesamt 8 hoch amplifizierten Fälle an Tumorabklatschpräparaten ließ sich auch am Gewebemultiblockschnitt eine High-Level-Amplifikation nachweisen.

Diese Gegenüberstellung macht deutlich, dass Low-Level-Amplifikationen nach Ventana bis auf eine Ausnahme am Gewebemultiblockschnitt gar nicht erfasst wurden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die Verschiebungen von Low-Level- und High-Level-Amplifikationen am Gewebemultiblockschnitt auf Schnitttechnik, Schnittdicke und Kernanschnitte zurückzuführen sind. Während Lebeau et al. (2001a) keine schnittbedingten Unterschiede hinsichtlich einer Low-Level-Amplifikation an Paraffinschnitten und an isolierten Tumorzellkernen fanden, beschrieben Pauletti et al. (1996) sowie Wang et al. (2002) eine Signalheterogenität bei 4 µm dicken Paraffinschnitten. Eine Schnittdicke über 5 µm kann zwar schnittbedingte Signalverluste minimieren, hat aber eine verstärkte Überlappung von Tumorzellkernen und damit eine erschwerte Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Folge.

Beim Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern wiesen 93,5% der Analysen am Gewebemultiblockschnitt dieser Dissertation geringere Werte als die entsprechenden Tumorabklatschpräparate auf (siehe 4.2.5., Seite 66). Die Untersuchung der durchschnittlichen Anzahl von CEP 17-Chromosomensignalen pro Tumorzellkern zeigte ein ähnliches Bild. Im Gegensatz zu Tumorabklatschpräparaten kam es am Gewebemultiblockschnitt zu einer deutlichen Reduzierung der CEP 17-Chromosomensignale. Bei Betrachtung der häufigsten Signalkombinationen stellte sich am Gewebemultiblockschnitt oftmals nur ein oder auch kein CEP 17-Chromosomensignal in den Tumorzellkernen vor allem nicht amplifizierter Fälle dar. Gleiche Ergebnisse fanden Murphy et al. (1995) bei FISH-Analysen an Paraffinschnitten von normalem Mammagewebe. Anstelle der zu erwartenden zwei CEP 17-Chromosomensignale hatten 30% bis 40% der Zellkerne ein oder kein CEP 17-Chromosomensignal.

Von einer schnittbedingten quantitativen Verringerung müssen HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale eigentlich gleichermaßen betroffen sein, wovon die Vysis-Ratio jedoch unbeeinträchtigt bliebe. Sowohl bei Gegenüberstellung der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und am Gewebemultiblockschnitt als auch im Streuungsdiagramm (siehe Abbildung 21, Seite 64) fiel auf, dass in 61,3% der Fälle die Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt über der an korrespondierenden Tumorabklatschpräparaten lag (siehe 4.2.3., Seite 63). Möglicherweise wirken sich die Kernanschnitte auf die quantitative Erfassung der CEP 17-Chromosomensignale in stärkerem Maße aus als auf die der HER-2/neu-Gensignale.

Eine weitere logische Konsequenz wäre, dass bei invasiven duktalem Karzinomen mit in der Regel größeren Tumorzellkernen im Gegensatz zu invasiven lobulären Karzinomen mit eher kleinen Tumorzellkernen vermehrt schnittbedingte Signalverluste vorkommen. Am Gewebemultiblockschnitt dieser Dissertation wurden vergleichsweise weniger HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale in invasiven duktalem als in invasiven lobulären Karzinomen gezählt. Ein exaktes Ausmessen der Zellkerngrößen könnte in weiterführenden Studien zusätzlich bestätigen, dass Kernanschnitte bei

invasiven duktaalen Karzinomen eine stärkere Signalreduktion zur Folge haben. Murphy et al. (1995) führten an einem 5 µm dicken Paraffinschnitt eines duktaalen Carcinoma-in-situ Zellkernmessungen durch und stellten eine große schnittbedingte Variabilität der Zellkerne von 5,8 µm bis 12,4 µm fest. Eine ähnliche Streubreite der Zellkerngrößen wäre für den Gewebemultiblockschnitt der vorliegenden Arbeit denkbar.

Bei Gegenüberstellung von Tumorabklatschpräparaten und konventionellen Paraffinschnitten kam es - bis auf zwei Ausnahmen (Fall-Nr. 62 und 71) - zu prinzipiell gleichen Verschiebungen von Low-Level- und High-Level-Amplifikationen, die jedoch weniger stark ausgeprägt waren als am Gewebemultiblockschnitt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich um einen verhältnismäßig dünnen Gewebemultiblockschnitt handelt. Durch eine Messung der Schnittdicken von Gewebemultiblockschnitt und konventionellen Paraffinschnitten ließe sich diese Vermutung verifizieren.

Aus der Bestimmung des HER-2/neu-Status gemäß der Ventana-Klassifizierung kann vorläufiges Fazit gezogen werden:

Aufgrund einer exakteren Signalerfassung konnte an Tumorabklatschpräparaten in 10 vergleichbaren Fällen eine Low-Level-Amplifikation ermittelt werden, während am Gewebemultiblockschnitt lediglich eine dieser Low-Level-Amplifikationen nachgewiesen wurde. Diese grenzwertig niedrig amplifizierten Fälle entgingen der Vysis-Ratio sowohl an Tumorabklatschpräparaten als auch am Gewebemultiblockschnitt und an konventionellen Paraffinschnitten.

Schnittbedingte Diskrepanzen bei der Auszählung von HER-2/neu-Genignalen beeinflussen die Ventana-Klassifizierung in stärkerem Maße als die Vysis-Ratio. Daher wurden lediglich in 87,1% bzw. 76,0% vergleichbarer Fälle übereinstimmende Ergebnisse nach Ventana an Tumorabklatschpräparaten und am Gewebemultiblockschnitt bzw. an konventionellen Paraffinschnitten erzielt.

5.3.3. Ermittlung des Aneuploidie-Status

Besonders in Fällen mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana ist die Kenntnis des Aneuploidie-Status von Bedeutung. Über die durchschnittliche Anzahl von CEP 17-Chromosomensignalen pro Tumorzellkern läßt sich eine tatsächlich vorhandene HER-2/neu-Genamplifikation von einer erhöhten durchschnittlichen Anzahl der HER-2/neu-Gensignale aufgrund einer Polysomie von Chromosom 17 unterscheiden (Jacobs et al. 1999, Pauletti et al. 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zur Bestimmung des Aneuploidie-Status darüberhinaus die häufigsten Signalkombinationen und die minimalen und maximalen Werte von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen berücksichtigt.

Von den 12 Low-Level-Amplifikationen an Tumorabklatschpräparaten konnte danach in drei Fällen eine Polysomie 17 nachgewiesen werden (Fall-Nr. 6, 117 und 129), während sich im Fall 35 der positive HER-2/neu-Status bestätigte (siehe Tabelle 5, Seite 55). Letzteres Ergebnis steht im Widerspruch zu Lebeau et al. (2001a) sowie Pauletti et al. (1996): Bei gleicher Betrachtungsweise wären in dieser Dissertation alle Fälle mit einer Low-Level-Amplifikation an Tumorabklatschpräparaten aufgrund einer Vysis-Ratio $< 2,0$ nicht amplifiziert (siehe 5.3.2., Seite 85). Durch die detaillierte Untersuchung der Signalverhältnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit wäre aber zumindest im niedrig amplifizierten Fall 35 eine Therapie mit Trastuzumab indiziert.

Die verbleibenden 8 Tumorabklatschpräparate wiesen sowohl Kriterien einer Amplifikation als auch Kriterien einer Aneuploidie auf. Hier konnte eine Amplifikation also nicht sicher ausgeschlossen werden. Möglicherweise lag in diesen Fällen auch ein erhöhter Prozentsatz derjenigen Zellen vor, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Mitose befanden. Zur weiteren Klärung müßte an diesen Tumorabklatschpräparaten neben einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung idealerweise eine Immunfluoreszenz mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung von Zellproliferations-assoziierten Proteinen wie zum Beispiel des Kernantigens Ki-67 durchgeführt werden. Auf diese Weise ließe sich die Proliferationsfraktion dieser Mammakarzinome bestimmen (Trihia et al.

2003). Dadurch wäre bei einer gleichzeitigen Vermehrung von HER-2/neu-Gen-signalen und CEP 17-Chromosomensignalen eine Differenzierung zwischen einer Polysomie 17 und einer erhöhten mitotischen Aktivität möglich.

Bei einer im Vergleich zur High-Level-Amplifikation geringeren Transkriptions- und Translationsrate sahen Jacobs et al. (1999) sowie Lebeau et al. (2001a) einen Zusammenhang von Low-Level-Amplifikation und schwacher membran-assoziiertes HER-2/neu-Rezeptor-Überexpression, die sich im Sinne eines HercepTest®-Scores von 2+ interpretieren ließe. Szöllösi et al. (1995) beschrieben eine Korrelation von HER-2/neu-Rezeptor-Überexpression und Polysomie 17. Sie nahmen an, dass dieselben Faktoren, die eine Aneuploidie hervorrufen, auch für Amplifikation und Überexpression verantwortlich sind. Demnach müssten in der vorliegenden Arbeit alle 12 Fälle mit einer Low-Level-Amplifikation bzw. Polysomie 17 eine schwache oder starke Membrananfärbung in 10% der Tumorzellen aufweisen (HercepTest®-Score 2+ bzw. 3+). Herzog (Med. Dissertation in Vorbereitung) ermittelte in einer Parallelstudie lediglich in 6 Fällen mit kombinierter Amplifikation und Aneuploidie einen HercepTest®-Score von 2+. Für die drei Fälle mit nachgewiesener Polysomie konnten die Aussagen von Szöllösi et al. (1995) bei fehlender HER-2/neu-Rezeptorüberexpression jedoch nicht aufrechterhalten werden.

Bei der Aufschlüsselung der Signalverhältnisse fand sich in 11 der 14 hoch amplifizierten Tumorabklatschpräparate eine begleitende Polysomie von Chromosom 17 (siehe Tabelle 6, Seite 56). Wang et al. (2002) stellten ebenfalls eine Vergesellschaftung von HER-2/neu-Genamplifikation und Polysomie bezüglich Chromosom 17 fest. Diese Ergebnisse ließen Wang et al. (2002) vermuten, dass eine Polysomie 17 in amplifizierten Fällen einen zusätzlichen additiven Effekt auf die Anzahl von HER-2/neu-Gen-signalen und damit auf die HER-2/neu-Amplifikation hat.

Analoge Untersuchungen zum Aneuploidie-Status nicht amplifizierter Tumorabklatschpräparate ergaben in 14 Fällen eine Polysomie und in 5 Fällen eine Monosomie von Chromosom 17.

Neben drei eindeutigen und identischen Monosomien (Fall-Nr. 32, 44 und 130) traten am Gewebemultiblockschnitt verstärkt Anzeichen einer Monosomie von Chromosom 17 auf, die wahrscheinlich auf der beschriebenen schnittbedingten Signalheterogenität beruhen. Ebenfalls als Folge der Schnitttechnik konnten in vergleichsweise weniger Fällen zumeist geringere Polysomie 17-Formen beobachtet werden.

Aus diesen Untersuchungen wird ersichtlich, dass durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem doppelmarkierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten neben der Bestimmung des HER-2/neu- und Aneuploidie-Status durch eine Aufschlüsselung der Signalverhältnisse zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden können. Speziell in Fällen mit einer Low-Level-Amplifikation gemäß der Ventana-Klassifizierung könnten diese für eine Therapie mit Trastuzumab von Bedeutung sein.

5.4. Stellenwert der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tumorabklatschpräparaten in der HER-2/neu-Diagnostik

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Bestimmung des HER-2/neu-Status von Mammakarzinomen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem modifizierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten durchführbar ist und repräsentative Ergebnisse liefert. Aufgrund einer sehr guten Übereinstimmung zur Paraffinhistologie (konventionellen Paraffinschnitten und Gewebemultiblockschnitt) ist den Tumorabklatschpräparaten ein gleichbedeutender Stellenwert in der HER-2/neu-Diagnostik des Mammakarzinoms einzuräumen.

Bei der quantitativen Erfassung der HER-2/neu-Gesignale und CEP 17-Chromosomensignale fanden sich an Tumorabklatschpräparaten die korrekteren Ergebnisse, da sie im Gegensatz zur Paraffinhistologie von schnittbedingten Signalverlusten nicht betroffen waren. Dies führte in 9,0% der untersuchten Tumorabklatschpräparate zur Detektion von Low-Level-Amplifikationen

gemäß der Klassifizierung nach Ventana, die jedoch im Gewebemultiblock - bis auf eine Ausnahme - bei dünnem Schnitt nicht erkannt wurden.

Durch die Vysis-Ratio wurden diese nach der Ventana-Klassifizierung grenzwertig niedrig amplifizierte Fälle weder an Tumorabklatschpräparaten noch an konventionellen Paraffinschnitten bzw. am Gewebemultiblockschnitt erfasst. Bei identischen Mammakarzinomen kommen die beiden Bewertungsmaßstäbe somit zu unterschiedlichen Ergebnissen, so dass keine definitive Aussage über den HER-2/neu-Status gemacht werden kann. Eine Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit Trastuzumab ist in diesen diskrepanten Fällen erheblich erschwert.

Eine endgültige Bewertung dieser Low-Level-Amplifikationen erfordert die Berücksichtigung der CEP 17-Chromosomensignale zum Ausschluss einer Polysomie. Durch die genaue Aufschlüsselung der Signalverhältnisse (durchschnittliche Anzahl von CEP 17-Chromosomensignalen pro Tumorzellkern, häufigste Signalkombinationen und minimale und maximale Werte von HER-2/neu-Gensignalen und CEP 17-Chromosomensignalen) war es in vier dieser Grenzfälle an Tumorabklatschpräparaten möglich, zwischen einer tatsächlichen Amplifikation und einer Vermehrung von HER-2/neu-Gensignalen bei Polysomie von Chromosom 17 zu differenzieren (eine Amplifikation, Polysomie in drei Fällen). Aufgrund der von Kernanschnitten unabhängigen Befunderhebung sind die Tumorabklatschpräparate bei Anwendung der Ventana-Klassifizierung und bei detaillierter Signalanalyse in diesen wenigen Fällen der Paraffin-histologie überlegen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde der Nachweis erbracht, dass die Ermittlung des HER-2/neu-Status an Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit abgeändertem Protokoll des doppelmarkierten PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kits durchführbar ist. Das für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Präparate optimierte Testverfahren konnte in der modifizierten Form an Tumorabklatschpräparaten etabliert werden. Ausfälle in 11,3% beruhten dabei auf technischen Problemen bei der Herstellung von Tumorabklatschpräparaten.

Im Vergleich zur Paraffinhistologie wurden bei der Bestimmung des HER-2/neu-Status an Tumorabklatschpräparaten repräsentative Ergebnisse erzielt: Anhand der Vysis-Ratio fand sich mit 100% bzw. 98,9% eine ausgezeichnete Übereinstimmung zu konventionellen Paraffinschnitten bzw. zum Gewebemultiblockschnitt, während bei der Klassifizierung nach Ventana die Übereinstimmung mit 76,0% bzw. 87,1% geringer war.

Diese Differenzen ließen sich auf eine korrektere quantitative Erfassung der HER-2/neu-Gensignale und CEP 17-Chromosomensignale an Tumorabklatschpräparaten zurückführen, da bei diesen im Gegensatz zur Paraffinhistologie keine schnittbedingten Signalverluste auftraten. Dadurch wurden in 9,0% der untersuchten Tumorabklatschpräparate Low-Level-Amplifikationen gemäß der Ventana-Klassifizierung aufgedeckt, die durch den Gewebemultiblock bei dünnem Schnitt bis auf eine Ausnahme nicht erfasst wurden. Diese grenzwertig niedrig amplifizierten Fälle wurden auch durch die Vysis-Ratio weder an Tumorabklatschpräparaten noch am Gewebemultiblockschnitt erkannt. Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse von Vysis-Ratio und Ventana-Klassifizierung ließ sich in diesen Grenzfällen keine definitive Aussage über den HER-2/neu-Status machen.

Durch detaillierte Signalanalyse konnte jedoch in 4 der insgesamt 12 Low-Level-Amplifikationen an Tumorabklatschpräparaten zwischen einer tatsächlichen Amplifikation ($n = 1$) und einer Vermehrung der HER-2/neu-Gensignale

bei Polysomie von Chromosom 17 ($n = 3$) unterschieden werden. Im Einzelfall ergeben sich dadurch mögliche therapeutische Konsequenzen für den Einsatz von Trastuzumab.

FISH-Analysen an Tumorabklatschpräparaten kommt somit ein der Paraffin-histologie gleichbedeutender Stellenwert in der HER-2/neu-Diagnostik des Mammakarzinoms zu. Bei Verwendung der Ventana-Klassifizierung und bei genauer Signalaufschlüsselung ist an Tumorabklatschpräparaten in wenigen Grenzfällen aufgrund der schnittunabhängigen und exakteren Signalerfassung eine differenziertere Befunderhebung im Vergleich zur Paraffinhistologie möglich.

Literaturverzeichnis

1. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986)
The product of the human c-erbB2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity
Science 232, 1644-1646
 2. Alroy I and Yarden Y (1997)
The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions
FEBS Lett 410, 83-86
 3. Andreasen PA, Kjöllér L, Christensen L, Duffy MJ (1997)
The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review
Int J Cancer 72, 1-22
 4. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002)
Krebs in Deutschland
3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken
 5. Arisio R, Sapino A, Cassoni P, Accinelli G, Cuccorese MC, Mano MP, Bussolati G (2000)
What modifies the relation between tumour size and lymph node metastases in T1 breast carcinomas?
J Clin Pathol 53, 846-850
 6. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L (1996)
Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer
J Clin Oncol 14, 737-744
 7. Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J (2001)
Mechanism of action of trastuzumab and scientific update
Semin Oncol 28 (Suppl 16), 4-11
 8. Battifora H (1986)
The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing
Lab Invest 55, 244-248
-

9. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996)
All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired
J Biol Chem 271, 5251-5257
 10. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK (1993)
Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu
Breast Cancer Res Treat 24, 85-95
 11. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, McKenzie S, Yin S, Bast RC Jr (1990)
Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer
Cancer Res 50, 4087-4091
 12. Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes, NE (1988)
Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading
Cancer Res 48, 1238-1243
 13. Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, van Putten WL, de Koning HY, Portengen H, Klijn JG (1995)
Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment
Gene 159, 11-18
 14. Berry DA, Muss HB, Thor AD, Dressler L, Liu ET, Broadwater G, Budman DR, Henderson IC, Barcos M, Hayes D, Norton L (2000)
HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer
J Clin Oncol 18, 3471-3479
 15. Bièche I and Lidereau R (1995)
Genetic alterations in breast cancer
Genes Chromosomes Cancer 14, 227-251
 16. Bongiorno PF, Whyte RI, Lesser EJ, Moore JH, Orringer MB, Beer DG (1994)
Alterations of K-ras, p53 and erbB-2/neu in human lung adenocarcinomas
J Thorac Cardiovasc Surg 107, 590-595
-

17. Borg Å, Baldetorp B, Fernö M, Killander D, Olsson H, Rydén S, Sigurdsson H (1994)
ERBB-2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer
Cancer Lett 81, 137-144
 18. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S (1996)
c-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastasis
J Clin Oncol 14, 2702-2708
 19. Carpenter G (1987)
Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens
Annu Rev Biochem 56, 881-914
 20. Carraway KL 3rd and Cantley LC (1994)
A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling
Cell 78, 5-8
 21. Carraway KL 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, Platko JV, Guy PM, Nuijens A, Diamonti AJ, Vandlen RL, Cantley LC, Cerione RA (1994)
The erbB3 gene product is a receptor for heregulin
J Biol Chem 269, 14303-14306
 22. Clark GM and McGuire WL (1991)
Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer
Cancer Res 51, 944-948
 23. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G, Slamon DJ (1999)
Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease
J Clin Oncol 17, 2639-2648
 24. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985)
Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene
Science 230, 1132-1139
 25. Devilee P and Cornelisse CJ (1994)
Somatic genetic changes in human breast cancer
Biochim Biophys Acta 1198, 113-130
-

26. Dougall WC, Qian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MI (1994)
The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies
Oncogene 9, 2109-2123
 27. Driouch K, Champème MH, Beuzelin M, Bièche I, Lidereau R (1997)
Classical gene amplifications in human breast cancer are not associated with distant solid metastases
Br J Cancer 76, 784-787
 28. Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, O'Sullivan J, Martino S, Osborne CK (1998)
HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study
Clin Cancer Res 4, 7-12
 29. Falck VG and Gullick WJ (1989)
c-erbB-2 oncogene product staining in gastric adenocarcinoma. An immunohistochemical study
J Pathol 159, 107-111
 30. Gaedcke J (Med. Dissertation in Vorbereitung)
Bestimmung von Expression und Amplifikation des Wachstumsfaktors HER2 bei Mammakarzinomen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)
Med. Dissertation, Universität Tübingen
 31. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994)
Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways
Annu Rev Cell Biol 10, 251-337
 32. Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE (1995)
Single-chain antibody-mediated intracellular retention of erbB-2 impairs neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling
Mol Cell Biol 15, 1182-1191
 33. Grushko TA, Blackwood MA, Schumm PL, Hagos FG, Adeyanju MO, Feldman MD, Sanders MO, Weber BL, Olopade OI (2002)
Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA1-associated breast cancers
Cancer Res 62, 1481-1488
 34. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd (1994)
Insect cell-expressed p180^{erbB3} possesses an impaired tyrosine kinase activity
Proc Natl Acad Sci USA 91, 8132-8136
-

35. Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Pölcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M (1999)
HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization allows risk-group assessment in node-negative breast cancer
Int J Oncol 14, 663-671
 36. Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Lebeau A, Permanetter W, Untch M (2001)
Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom, 39-43
In: *Manual Mammakarzinome des Tumorzentrums München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*
8. Auflage, Zuckschwerdt, München
 37. Harbeck N und Thomssen C (2002)
Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom, 16-23
In: *State of the Art Meeting Gravenbruch 2002: Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome*
Zuckschwerdt, München
 38. Hayes DF and Thor AD (2002)
c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker
Semin Oncol 29, 231-245
 39. Heldin CH (1995)
Dimerization of cell surface receptors in signal transduction
Cell 80, 213-223
 40. Herzog S (Med. Dissertation in Vorbereitung)
Evaluation der HER-2/neu-Genamplifikation an Tumorabklatschpräparaten von Mammakarzinomen mittels FISH und deren Wertigkeit im Vergleich zur immunhistochemischen, membranassoziierten Überexpression
Med. Dissertation, Universität Tübingen
 41. Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Cha SS, Podratz KC (1992)
HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer
Gynecol Oncol 47, 179-185
 42. Hirashima N, Takahashi W, Yoshii S, Yamane T, Ooi A (2001)
Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in pulmonary carcinomas: a comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study
Mod Pathol 14, 556-562
 43. Hung MC and Lau YK (1999)
Basic science of HER-2/neu: a review
Semin Oncol 26 (Suppl 12), 51-59
-

44. Hynes NE and Stern DF (1994)
The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer
Biochim Biophys Acta 1198, 165-184
 45. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK (2002)
Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail
Nature 416, 279-280
 46. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ (1999)
Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer
J Clin Oncol 17, 1974-1982
 47. Johnson RC, Ricci A Jr, Cartun RW, Ackroyd R, Tsongalis GJ (2000)
p185 (HER2) overexpression in human breast cancer using molecular and immunohistochemical methods
Cancer Invest 18, 336-342
 48. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen L-C, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992)
ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization
Proc Natl Acad Sci USA 89, 5321-5325
 49. Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001)
Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer
Hum Mol Genet 10, 657-666
 50. Kaufmann M und Kanz L (2000)
Immuntherapie der Mammakarzinome mit Herceptin: Zweiter Expertenworkshop „Neue Entwicklungen bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms“
Deutsches Ärzteblatt 97, 13, B-723 - B-726
 51. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA (1990)
p185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival
Cancer Res 50, 5184-5191
 52. King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985)
Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma
Science 229, 974-976
-

53. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y (1999)
The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors
Proc Natl Acad Sci USA 96, 4995-5000
 54. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y (2000)
Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors
Adv Cancer Res 77, 25-79
 55. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991)
SH-2 and SH-3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins
Science 252, 668-674
 56. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi O-P (1998)
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens
Nat Med 4, 844-847
 57. Lebeau A und Löhrs U (2001)
HER-2- Diagnostik beim Mammakarzinom, 9-13
In: Aktuelle Onkologie: Herceptin® + Taxol®: Die Partner des neuen Therapiestandards
Band 114, Zuckschwerdt, München
 58. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Löhrs U (2001a)
HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization
J Clin Oncol 19, 354-363
 59. Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W (2001b)
Pathomorphologie des Mammakarzinoms, 18-33
In: Manual Mammakarzinome des Tumorzentrums München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge
8. Auflage, Zuckschwerdt, München
 60. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harvey H, Demers L, Lipton A (1995)
Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer
J Clin Oncol 13, 1129-1135
-

61. Lemoine NR, Staddon S, Dickson C, Barnes DM, Gullick WJ (1990)
Absence of activating transmembrane mutations in the c-erbB-2 proto-oncogene in human breast cancer
Oncogene 5, 237-239

 62. Leyland-Jones B (2001)
Maximizing the response to Herceptin® therapy through optimal use and patient selection
Anticancer Drugs 12 (Suppl 4), 11-17

 63. Lohrisch C and Piccart M (2001)
An overview of HER2
Semin Oncol 28 (Suppl 18), 3-11

 64. Lupu R, Cardillo M, Harris L, Hijazi M, Rosenberg K (1995)
Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance
Semin Cancer Biol 6, 135-145

 65. Margolis BL, Lax I, Kris R, Dombalagian M, Honegger AM, Howk R, Givol D, Ullrich A, Schlessinger J (1989)
All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor
J Biol Chem 264, 10667-10671

 66. Mass RD, Sanders C, Charlene K, Johnson L, Everett T, Anderson S (2000)
The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials
Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 19, 75a, abstract 291

 67. Mass RD, Press M, Anderson S, Murphy M, Slamon DJ (2001)
Improved survival benefit from herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH)
Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 20, 22a, abstract 85

 68. McKeage K and Perry CM (2002)
Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2
Drugs 62, 209-243

 69. Mirlacher M und Storz M (2000)
Gewebe Chips für die molekulare Untersuchung von Tumoren
Labmed 27, 293-297
-

70. Murphy DS, McHardy P, Coutts J, Mallon EA, George WD, Kaye SB, Brown R, Keith WN (1995)
Interphase cytogenetic analysis of erbB2 and topoll α co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ
Int J Cancer 64, 18-26
 71. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA (1982)
Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas
Cell 28, 865-871
 72. Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR (1990)
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, 103-112
 73. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N (2000)
HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15
J Natl Cancer Inst 92, 1991-1998
 74. PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit, Protokoll 2001
Abbott/Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA
 75. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ (1996)
Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization
Oncogene 13, 63-72
 76. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ (2000)
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, 3651-3664
 77. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, Wong EY, Yang SJ, Masood S (2000)
Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study
Ann Clin Lab Sci 30, 41-48
-

78. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ (1995)
HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells
Oncogene 10, 2435-2446
 79. Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Guarino BC, Wang LM, Lyass L, Alroy I, Alamandi M, Kuo A, Moyer JD, Lavi S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Seger R, Bacus SS, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y (1998)
ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network
Mol Cell Biol 18, 6090-6101
 80. Popescu NC, King CR, Kraus MH (1989)
Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32
Genomics 4, 362-366
 81. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ (1994a)
Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression
Cancer Res 54, 2771-2777
 82. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, El-Naggar AK (1994b)
Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis
Cancer Res 54, 5675-5682
 83. Rajkumar T and Gullick WJ (1994)
The type I growth factor receptors in human breast cancer
Breast Cancer Res Treat 29, 3-9
 84. Rampaul RS, Pinder SE, Gullick WJ, Robertson JFR, Ellis IO (2002)
HER-2 in breast cancer - methods of detection, clinical significance and future prospects for treatment
Crit Rev Oncol Hematol 43, 231-244
 85. Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998)
ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance
Eur J Cancer 34, 791-808
 86. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L (1995)
Immunohistochemical detection of HER-2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis
Cancer 75, 1320-1326
-

87. Ross JS and Fletcher JA (1999)
HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer
Am J Clin Pathol 112 (Suppl 1), 53-67
 88. Rubin I and Yarden Y (2001)
The basic biology of HER2
Ann Oncol 12 (Suppl 1), 3-8
 89. Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F (1993)
Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer
Cancer Res 53 (Suppl), 2199-2203
 90. Schaller G und Untch M (2002)
Humanisierte Antikörper in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms, 190-194
In: State of the Art Meeting Gravenbruch 2002: Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome
Zuckschwerdt, München
 91. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA (1984)
The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-M_r tumour antigen
Nature 312, 513-516
 92. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi O-P, Sauter G (1999)
Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types
Clin Cancer Res 5, 1966-1975
 93. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T (1985)
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 USA 82, 6497-6501
 94. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DH, McCaul K, Setlur V, Kitchen P (1993)
Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group
J Clin Oncol 11, 1936-1942
-

95. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC, Fendly BM, Maneval D, Mordenti J, Figari I, Kotts CE, Palladino MA Jr, Ullrich A, Slamon DJ (1991)
Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic
J Clin Immunol 11, 117-127
 96. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA (1981)
Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts
Nature 290, 261-264
 97. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987)
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene
Science 235, 177-182
 98. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989)
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer
Science 244, 707-712
 99. Slamon DJ and Pegram M (2001)
Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials
Semin Oncol 28 (Suppl 3), 13-19
 100. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001)
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2
N Engl J Med 344, 783-792
 101. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd (1994)
Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin
J Biol Chem 269, 14661-14665
 102. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA (1999)
Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)
Semin Oncol 26 (Suppl 12), 60-70
 103. Statistisches Bundesamt (1998)
Todesursachenstatistik in Deutschland
Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4, Metzler Poeschel, Stuttgart
-

104. Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986)
p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor-like protein associated with tyrosine kinase activity
Mol Cell Biol 6, 1729-1740
 105. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM (1995)
ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185^{HER-2} overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer
Cancer Res 55, 5400-5407
 106. Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, Biermann JS, Baker L (2002)
Absence of HER2/neu gene expression in osteosarcoma and skeletal Ewing's sarcoma
Clin Cancer Res 8, 788-793
 107. Thor A (2001)
HER2- a discussion of testing approaches in the USA
Ann Oncol 12 (Suppl 1), 101-107
 108. Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H (1992)
Prognostic significance of HER2-oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up
J Clin Oncol 10, 1044-1048
 109. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, Coates A, Collins J, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA (2003)
Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors- a surrogate marker?
Cancer, 97, 1321-1331
 110. Treish I, Schwartz R, Lindley C (2000)
Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer
Am J Health Syst Pharm 57, 2063-2076
 111. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996)
A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor
Mol Cell Biol 16, 5276-5287
 112. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ (1987)
Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification
Lancet 2, 69-72
-

113. van de Vijver MJ (1993)
Molecular genetic changes in human breast cancer
Adv Cancer Res 61, 25-56
 114. Vogel U (unveröffentlichte Befunde)
Institut für Pathologie der Universität Tübingen
 115. Wada T, Qian XL, Greene MI (1990)
Intermolecular association of the p185^{neu} protein and EGF receptor
modulates EGF receptor function
Cell 61, 1339-1347
 116. Wang S-C, Zhang L, Hortobagyi GN, Hung M-C (2001)
Targeting HER2: recent developments and future directions for breast
cancer patients
Semin Oncol 28 (Suppl 18), 21-29
 117. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT,
Gokaslan S, Hynan L, Ashfaq R (2002)
Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression
and implication for clinical assessment of HER-2/neu status
Mod Pathol 15, 137-145
 118. Weiss A and Schlessinger J (1998)
Switching signals on or off by receptor dimerization
Cell 94, 277-280
 119. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF (2001)
When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as
a predictive factor in breast cancer
J Clin Oncol 19, 2334-2356
 120. Yarden Y (1990)
Agonistic antibodies stimulate the kinase encoded by the neu
protooncogene in living cells but the oncogenic mutant is constitutively
active
Proc Natl Acad Sci USA 87, 2569-2573
-

Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1</u>	Schematische Darstellung der vier HER-Rezeptoren	Seite 3
<u>Abb. 2</u>	Schematische Darstellung der HER-2/neu-Rezeptor-Aktivierung	Seite 4
<u>Abb. 3</u>	Gegenüberstellung von normaler Zelle und HER-2/neu-positiver Tumorzelle	Seite 7
<u>Abb. 4</u>	Empfohlene diagnostische Vorgehensweise zur Bestimmung des HER-2/neu-Status beim Mammakarzinom	Seite 12
<u>Abb. 5</u>	Schematische Darstellung der FISH-Technik	Seite 21
<u>Abb. 6</u>	Aufbau und Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops (Schema)	Seite 23
<u>Abb. 7</u>	Kartierung von Chromosom 17 mit HER-2/neu-Gensonde und CEP 17-Zentromersonde (schematisch)	Seite 24
<u>Abb. 8</u>	Beispiele und Richtlinien zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit	Seite 29
<u>Abb. 9</u>	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	Seite 34
<u>Abb. 10</u>	Herstellung eines Gewebemultiblocks (schematisch)	Seite 37
<u>Abb. 11</u>	Tumorzellkern mit 2 HER-2/neu Gensignalen (orange) und 2 CEP 17-Chromosomensignalen (grün), Fall 51 am Tumorabklatschpräparat	Seite 48
<u>Abb. 12</u>	Tumorzellkern mit 3 HER-2/neu-Gensignalen (orange) und 3 CEP 17-Chromosomensignalen (grün), Fall 30 am Tumorabklatschpräparat	Seite 48
<u>Abb. 13</u>	Tumorzellkern mit 25 HER-2/neu-Gensignalen (orange, Clusterbildung) und 4 CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation, Fall 33 am Tumorabklatschpräparat	Seite 49

<u>Abb. 14</u>	5 Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Gensignalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation (30/3, 33/3, 27/3, 28/3 und 28/3, jeweils Clusterbildung, unterschiedliche Schärfeniveaus), Fall 33 am Tumorabklatschpräparat	Seite 49
<u>Abb. 15</u>	Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Gensignalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) (auf dieser Schärfeniveaus: 2/2, 2/2, 2/2, 1/1 und 1/1), Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz, Fall 14 am Gewebemultiblockschnitt	Seite 50
<u>Abb. 16</u>	4 Tumorzellkerne mit verschiedenen Kombinationen von HER-2/neu-Gensignalen (orange) / CEP 17-Chromosomensignalen (grün) bei High-Level-Amplifikation (9/1, 16/3, 15/1 und 13/1, teilweise Clusterbildung, unterschiedliche Schärfeniveaus), Zytokeratin-8-Immunfluoreszenz, Fall 63 am Gewebemultiblockschnitt	Seite 50
<u>Abb. 17</u>	Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (n = 133)	Seite 51
<u>Abb. 18</u>	Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern (\emptyset HER-2) an Tumorabklatschpräparaten (n = 133)	Seite 53
<u>Abb. 19</u>	Prozentuale Verteilung der Gründe für die Ausfälle am Gewebemultiblockschnitt (n = 63)	Seite 59
<u>Abb. 20</u>	Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt (n = 108)	Seite 61
<u>Abb. 21</u>	Beziehung zwischen Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten und Vysis-Ratio am Gewebemultiblockschnitt (n = 93)	Seite 64
<u>Abb. 22</u>	Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern	Seite 65

	(ØHER-2) am Gewebemultiblockschnitt (n = 108)	
<u>Abb. 23</u>	Prozentuale Verteilung der Vysis-Ratio an Paraffinschnitten (n = 25)	Seite 69
<u>Abb. 24</u>	Prozentuale Verteilung der durchschnittlichen Anzahl von HER-2/neu-Gensignalen pro Tumorzellkern (ØHER-2) an Paraffinschnitten (n = 25)	Seite 71

Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 1</u>	Methoden zur Ermittlung des HER-2/neu-Status	Seite 10
<u>Tab. 2</u>	Gegenüberstellung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem PathVysion™ HER-2 DNA Sonden-Kit an Tumorabklatschpräparaten, konventionellen Paraffinschnitten und am Gewebemultiblockschnitt	Seite 42
<u>Tab. 3</u>	Auswertungstabelle I nach Abbott/Vysis für Fall 21	Seite 47
<u>Tab. 4</u>	Auswertungstabelle II zur schriftlichen Fixierung der Signalkombinationen von 60 ausgezählten Tumorzellkernen für Fall 21	Seite 47
<u>Tab. 5</u>	Tumorabklatschpräparate mit einer Low-Level-Amplifikation nach Ventana (n = 12)	Seite 55
<u>Tab. 6</u>	Tumorabklatschpräparate mit einer High-Level-Amplifikation nach Ventana (n = 14)	Seite 56
<u>Tab. 7</u>	Differenzen in der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (TAP) und am Gewebemultiblockschnitt (TMA) (n = 93)	Seite 62
<u>Tab. 8</u>	Differenzen in der Vysis-Ratio an Tumorabklatschpräparaten (TAP) und an Paraffinschnitten (FFPE) (n = 25)	Seite 70

Anhang

Gesamtauswertungstabelle: FISH-Ergebnisse an Tumorabklatschpräparaten (TAP), am Gewebemultiblockschnitt (TMA) und an konventionellen Paraffinschnitten (FFPE)

- Ratio = Quotient aus der durchschnittl. Anzahl der HER-2/neu-Gensignale (ungerundet) und der durchschnittl. Anzahl der CEP 17-Chromosomensignale (ungerundet) bei 60 Tumorzellkernen (Vysis-Ratio, gerundet)
- ØHER-2 = durchschnittl. Anzahl der HER-2/neu-Gensignale pro Tumorzellkern (Ventana-Klassifizierung, gerundet)
- ØCEP17 = durchschnittl. Anzahl der CEP 17-Chromosomensignale pro Tumorzellkern (gerundet)
- min.-max. HER-2 = minimale und maximale Werte der HER-2/neu-Gensignale
- min.-max. CEP17 = minimale und maximale Werte der CEP 17-Chromosomensignale

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	ØHER-2	ØCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	ØHER-2	ØCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	ØHER-2	ØCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
1	1,3	3,7	2,8	4/3 (36), 3/3 (10)	2-4	2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,0	2,0	1,9	2/2 (51)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,3	2,6	2,1	2/2 (33), 3/2 (11)	1-6	1-4	1,1	1,6	1,4	2/1 (18), 1/1 (17), 2/2 (14)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
4	1,1	3,7	3,5	4/4 (27), 4/3 (12), 3/3 (10)	2-5	2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,3	5,0	3,8	5/4 (17), 6/4 (14), 4/4 (11)	3-7	2-4	1,9	4,7	2,4	4/2 (9), 5/3 (7), 5/2 (6)	2-7	1-4	-	-	-	-	-	-

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
6	1,1	4,6	4,1	3/3 (20), 6/5 (7), 5/5 (6), 6/6 (6)	3-7	2-7	1,3; 1,3	2,4; 2,2	1,8; 1,7	2/2 (23), 2/1 (12); 2/2 (16), 1/1 (10), 3/1 (10)	1-4; 1-4	1-3; 1-4	-	-	-	-	-	-
7	1,0	1,9	1,9	2/2 (46)	1-2	1-2	1,1	1,8	1,6	2/2 (34), 1/1 (12), 2/1 (10)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
8	1,0	3,6	3,5	4/4 (13), 3/3 (12)	2-7	2-5	1,4	3,0	2,2	2/2 (13), 3/1 (8), 3/2 (8)	1-7	1-5	-	-	-	-	-	-
9	1,9	3,9	2,1	4/2 (34), 3/2 (11)	1-8	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1,1	2,2	2,0	2/2 (45)	1-4	1-2	1,3	2,0	1,6	2/2 (18), 2/1 (15), 1/1 (10)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
11	1,1	2,1	1,9	2/2 (46)	1-4	1-4	1,3	2,1	1,6	2/2 (20), 2/1 (17), 1/1 (13)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
12	1,1	2,0	1,9	2/2 (48)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1,0	3,0	2,9	2/2 (19), 3/3 (13), 4/4 (13)	2-5	1-5	1,3	2,0	1,5	2/2 (25), 2/1 (22)	1-4	1-2	-	-	-	-	-	-
14	1,1	2,2	2,0	2/2 (40)	1-4	1-4	1,2	2,0	1,7	2/2 (28), 2/1 (12), 1/1 (10)	1-5	1-3	-	-	-	-	-	-
15	1,0	2,3	2,3	2/2 (47)	2-6	1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1,4	2,1	1,5	2/2 (26), 2/1 (18)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1,0	2,3	2,2	2/2 (44)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1,1	2,1	1,9	2/2 (49)	1-4	1-3	1,2	2,0	1,7	2/2 (24), 1/1 (11), 2/1 (11)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
19	1,1	3,6	3,3	4/4 (23), 3/3 (11)	2-5	2-4	1,3; 1,3	2,2; 2,1	1,8; 1,7	2/2 (24), 2/1 (11), 3/2 (8); 2/2 (16), 1/1 (14), 2/1 (12)	1-4; 1-4	1-3; 1-4	-	-	-	-	-	-
20	1,0	2,2	2,2	2/2 (51)	2-4	1-4	1,1	1,5	1,3	1/1 (27), 2/1 (14), 2/2 (14)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
21	1,1	2,2	2,0	2/2 (44)	2-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	1,1	3,4	3,1	3/3 (33)	2-7	2-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	3,1	16,7	5,4	16-20/6 (10), 11-15/5 (8), 16-20/7 (7)	5-27	1-8	-	-	-	-	-	-	3,6	10,7	3,0	11-15/3	4-21+	1-8
24	1,3	4,5	3,3	5/4 (16), 4/4 (7), 5/3 (6), 6/4 (6)	2-6	1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1,1	2,8	2,5	2/2 (25), 4/4 (11)	2-4	1-4	1,3	2,3	1,8	2/2 (24), 2/1 (9), 1/1 (8)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
26	1,0	3,1	3,2	4/4 (19), 3/3 (16), 2/2 (12)	2-4	2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1,1	2,1	1,9	2/2 (45)	2-4	1-3	1,2	1,8	1,5	2/2 (24), 1/1 (16), 2/1 (12)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
28	0,8	2,1	2,7	2/3 (34), 2/2 (14)	1-4	1-3	0,9	1,8	1,9	2/2 (22), 1/1 (10), 2/1 (10)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
29	1,3	2,3	1,8	2/2 (33)	1-4	1-2	1,2	2,1	1,8	2/2 (29), 1/1 (10), 2/1 (9)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
30	1,1	2,8	2,6	3/3 (36)	2-4	1-3	1,2; 1,1	2,0; 2,0	1,7; 1,8	2/2 (26), 2/1 (12), 1/1 (8); 2/2 (21), 1/1 (14), 2/1 (9)	1-3; 1-4	1-3; 1-4	-	-	-	-	-	-
31	1,5	3,0	2,1	3/2 (30), 2/2 (10)	2-5	1-4	1,8	2,7	1,5	2/1 (15), 2/2 (10), 3/1 (10), 3/2 (9)	1-7	1-3	-	-	-	-	-	-
32	1,0	1,7	1,7	2/2 (30), 1/1 (21)	1-4	1-4	1,0	1,0	1,0	1/1 (60)	1	1	-	-	-	-	-	-

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
33	6,8	23,4	3,4	21-30/3 (19), 21-30/4 (16), 16-20/3 (7)	14-35	2-4	6,4	12,5	2,0	11-15/2 (14), 16-20/2 (9)	4-20	1-4	-	-	-	-	-	-
34	1,0	2,2	2,1	2/2 (39)	1-4	1-4	1,3; 1,3	1,8; 1,7	1,4; 1,3	2/1 (24), 2/2 (24), 1/1 (10); 2/1 (20), 1/1 (19), 2/2 (17)	1-2; 1-3	1-2; 1-2	-	-	-	-	-	-
35	1,9	4,4	2,4	3/2 (23), 4/2 (11)	2-8	1-4	1,1; 1,7	2,7; 2,6	2,4; 1,5	2/2 (12), 3/3 (9), 3/2 (8); 2/1 (14), 2/2 (13), 3/1 (11)	1-5; 1-6	1-5; 1-3	-	-	-	-	-	-
36	1,0	2,1	2,0	2/2 (43)	1-6	1-5	1,3	1,8	1,3	1/1 (20), 2/1 (18), 2/2 (10)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
37	1,1	1,8	1,7	2/2 (37), 1/1 (13)	1-3	1-3	1,1	1,3	1,2	1/1 (39), 2/1 (11), 2/2 (8)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
38	3,5	13,0	3,7	11-15/3 (16), 11-15/4 (16)	6-29	2-6	2,8	6,4	2,3	7/2 (11), 6/2 (6)	2-11	1-4	-	-	-	-	-	-
39	1,4	5,4	3,9	6/4 (15), 5/4 (11), 4/4 (6)	2-8	2-6	1,1	1,8	1,7	2/2 (22), 1/1 (15), 1/2 (7), 3/2 (7)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
40	1,1	2,0	1,8	2/2 (46)	1-3	1-3	1,2	1,6	1,3	1/1 (24), 2/2 (17), 2/1 (16)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
41	1,1	2,0	1,8	2/2 (45)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	1,0	1,9	1,9	2/2 (45)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	1,3	3,4	2,6	4/3 (18), 2/2 (14)	1-6	2-4	1,1	2,3	2,1	2/2 (28), 3/3 (9)	1-4	1-5	-	-	-	-	-	-
44	1,0	1,3	1,2	1/1 (45)	1-3	1-2	1,0	1,1	1,1	1/1 (53)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
45	1,2	2,5	2,0	2/2 (37), 3/2 (18)	2-4	2	1,2	1,6	1,4	2/2 (21), 1/1 (19), 2/1 (17)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
46	1,0	2,1	2,0	2/2 (54)	1-4	1-4	1,3	1,8	1,4	2/2 (18), 1/1 (17), 2/1 (17)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
47	1,0	2,2	2,2	2/2 (43)	1-5	1-4	1,1; 1,1	1,8; 1,7	1,7; 1,6	2/2 (36), 1/1 (10), 2/1 (10); 2/2 (25), 2/1 (17), 1/1 (10)	1-3; 1-2	1-3; 1-3	1,1	1,7	1,5	2/2	1-4	1-4
48	6,7	28,1	4,2	21-30/4 (16), 21-30/3 (11), 21-30/5 (10)	18-41	3-6	-	-	-	-	-	-	5,8	19,5	3,4	21+/4	11-21+	1-7
49	1,2	2,3	2,0	2/2 (39)	2-4	1-4	1,2; 1,2	1,7; 1,9	1,4; 1,5	2/1 (21), 2/2 (20), 1/1 (15); 2/1 (18), 1/1 (14), 2/2 (14)	1-3; 1-4	1-3; 1-5	-	-	-	-	-	-
50	1,0	1,9	1,9	2/2 (46)	1-2	1-2	1,1	1,7	1,5	2/2 (27), 1/1 (15), 2/1 (13)	1-3	1-2	1,1	1,9	1,8	2/2	1-3	1-3
51	1,0	1,9	1,9	2/2 (47)	1-3	1-2	1,3	2,2	1,7	2/2 (15), 2/1 (14), 1/1 (10)	1-4	1-3	1,8	3,5	1,8	?	1-7	1-4
52	1,2	2,3	1,9	2/2 (38)	1-5	1-3	-	-	-	-	-	-	1,0	1,3	1,3	1/1	1-2	1-2
53	8,6	18,5	2,1	16-20/2 (29), 11-15/2 (11), 21-30/2 (11)	8-36	1-4	7,4	10,5	1,4	11-15/1 (18), 11-15/2 (7), 9/1 (6)	5-17	1-3	-	-	-	-	-	-
54	1,2	3,5	3,0	3/3 (17), 4/3 (10)	2-7	2-5	-	-	-	-	-	-	1,2	3,1	2,7	4/3	1-6	1-4
55	1,6	4,3	2,8	4/2 (20), 4/3 (13), 3/2 (6)	2-8	2-5	1,3	2,4	1,8	2/2 (14), 3/2 (13), 2/1 (10)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
56	1,1	1,3	1,2	1/1 (43)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	1,1	2,9	2,5	3/3 (27), 3/2 (15), 2/2 (13)	2-6	1-4	1,1	1,6	1,4	1/1 (25), 2/2 (19), 2/1 (10)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
58	1,1	2,0	1,9	2/2 (51)	2-3	1-2	1,1	1,7	1,6	2/2 (26), 1/1 (17), 2/1 (11)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
59	1,0	2,2	2,2	2/2 (37)	1-4	1-4	1,0	1,9	1,9	2/2 (21), 1/1 (11), 2/1 (9)	1-4	1-4	1,3	1,9	1,4	2/2	1-4	1-3
60	1,0	2,0	2,0	2/2 (52)	1-3	1-4	1,3	2,0	1,6	2/2 (18), 1/1 (13), 2/1 (12)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
61	1,3	3,0	2,2	3/2 (29), 2/2 (11)	1-5	1-4	1,2	1,7	1,5	1/1 (19), 2/2 (18), 2/1 (16)	1-5	1-4	1,8	2,6	1,5	3/1	1-6	1-2
62	1,1	4,1	3,6	4/4 (21), 5/4 (14), 4/3 (5), 5/3 (5)	2-6	2-5	-	-	-	-	-	-	1,5	4,6	3,2	6/4	1-10	1-6
63	5,8	15,7	2,7	16-20/3 (27), 11-15/2 (13), 11-15/3 (13)	10-24	2-3	7,3	12,6	1,7	11-15/1 (13), 11-15/2 (11)	5-24	1-3	4,9	11,9	2,4	10-15/2	10-20	1-6
64	1,1	2,0	1,9	2/2 (50)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	1,0	1,7	1,6	2/2	1-3	1-3
65	1,1	1,3	1,2	1/1 (41), 2/2 (10)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	1,3	2,6	2,1	3/2 (26), 2/2 (19)	1-5	1-4	1,3	1,8	1,4	2/1 (20), 2/2 (19), 1/1 (15)	1-3	1-2	1,1	2,1	1,9	2/2	1-4	1-3
67	1,3	2,4	1,9	2/2 (27), 3/2 (21)	1-4	1-3	1,2	1,7	1,4	2/1 (22), 2/2 (22), 1/1 (12)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
68	1,1	4,1	3,8	4/4 (23), 4/3 (9), 5/4 (9), 5/5 (9)	2-5	1-5	1,2	2,7	2,2	3/2 (12), 3/3 (10), 2/2 (9)	1-4	1-5	-	-	-	-	-	-
69	1,1	2,5	2,3	2/2 (34)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	1,1	1,9	1,8	2/2	1-3	1-3
70	1,1	3,3	3,1	3/3 (20), 2/2 (9)	1-6	1-6	1,4	3,3	2,4	4/3 (9), 3/2 (7), 3/3 (7)	1-10	1-5	-	-	-	-	-	-
71	1,2	3,5	3,0	2/2 (18), 4/3 (7), 4/4 (7)	2-9	1-5	1,1	2,3	2,0	2/2 (23), 3/3 (9), 1/1 (8)	1-4	1-4	1,2	4,3	3,6	3/3	1-10	1-8
72	1,1	2,4	2,2	2/2 (37)	2-4	1-3	1,1	1,9	1,8	2/2 (19), 1/1 (12), 2/1 (8)	1-3	1-4	1,2	2,8	2,3	3/3	1-5	1-4
73	1,1	2,5	2,3	2/2 (30)	1-4	1-4	1,2	2,3	1,9	2/2 (14), 2/1 (11), 3/2 (9)	1-4	1-5	1,2	1,9	1,6	2/1	1-4	1-4
74	0,7	2,0	2,7	2/3 (41)	2	2-4	0,9	1,8	2,1	2/2 (20), 2/3 (14)	1-3	1-4	-	-	-	-	-	-
75	1,0	1,9	1,9	2/2 (39)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	1,0	3,3	3,3	4/4 (25), 2/2 (15)	2-5	1-4	1,2	1,7	1,4	2/1 (22), 2/2 (22), 1/1 (13)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
77	0,9	2,6	2,8	2/2 (25), 4/4 (10)	1-5	1-5	0,8	1,1	1,4	1/1 (32), 1/2 (20)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
78	0,7	1,6	2,3	2/2 (31)	1-2	2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	0,9	3,2	3,4	4/4 (20), 3/4 (14)	2-4	1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	1,1	2,0	1,9	2/2 (46)	1-3	1-2	1,3	1,7	1,3	2/1 (23), 1/1 (16), 2/2 (14)	1-4	1-2	-	-	-	-	-	-
81	1,1	3,3	3,1	3/3 (16), 4/4 (14), 2/2 (9)	2-5	1-4	1,2	2,8	2,3	2/2 (15), 3/3 (14), 3/2 (12)	2-4	1-4	-	-	-	-	-	-
82	1,0	2,0	2,1	2/2 (36)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	1,1	3,5	3,2	4/3 (15), 3/3 (10), 4/4 (10)	2-6	2-5	1,1	1,7	1,5	1/1 (20), 2/1 (13), 2/2 (11)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
84	1,1	2,2	1,9	2/2 (39)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	1,0	1,9	1,8	2/2 (45)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	1,1	2,0	1,9	2/2 (47)	1-4	1-2	1,3	1,8	1,3	2/1 (25), 2/2 (17), 1/1 (13)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
87	1,1	2,3	2,0	2/2 (35)	1-5	1-4	1,0	1,6	1,5	2/2 (21), 1/1 (19), 2/1 (12)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
88	1,0	1,9	1,9	2/2 (47)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	1,0	2,0	2,1	2/2 (41)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	0,9	1,8	2,0	2/2 (41)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	1,0	2,0	2,0	2/2 (39)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	1,0	3,6	3,5	4/4 (33)	2-5	2-4	1,2	3,3	2,8	3/3 (16), 3/2 (10), 4/4 (8)	1-7	1-5	-	-	-	-	-	-
93	1,1	2,5	2,4	2/2 (27), 4/4 (8)	1-4	1-4	1,2	1,8	1,5	2/2 (21), 2/1 (20), 1/1 (10)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
94	4,5	11,4	2,5	11-15/3 (21), 11-15/2 (13)	5-17	1-4	3,2	7,1	2,2	6/2 (7), 5/2 (6), 8/3 (5)	3-14	1-4	2,7; 3,4	8,9; 8,5	3,3; 2,5	11-15/3; 11-15/3	5-21+; 1-20	1-9; 1-5
95	1,3	2,2	1,7	2/1 (24), 2/2 (22)	1-4	1-4	1,7	2,6	1,5	2/1 (15), 3/1 (12), 2/2 (11)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
96	3,8	14,7	3,9	11-15/4 (23), 11-15/3 (9), 16-20/3 (8), 16-20/4 (7), 11-15/5 (7)	10-23	3-6	4,1	14,3	3,5	11-15/3 (13), 11-15/4 (6)	7-30	1-7	-	-	-	-	-	-
97	1,0	2,0	2,0	2/2 (45)	1-4	1-4	1,2	1,7	1,5	2/2 (23), 2/1 (19), 1/1 (14)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
98	1,0	2,0	2,0	2/2 (44)	1-4	1-4	1,2	2,5	2,1	2/2 (16), 3/3 (13), 3/2 (10)	1-5	1-4	1,2	2,8	2,3	2/2, 3/2, 4/3	1-6	1-4
99	1,1	2,2	2,0	2/2 (47)	1-4	1-3	1,3	2,0	1,5	2/1 (20), 2/2 (17), 1/1 (10)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
100	6,3	15,1	2,4	11-15/2 (10), 16-20/3 (4), 16-20/2 (3), 21-30/4 (3)	7-23	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	5,0	14,6	3,0	11-15/2 (11), 16-20/4 (8), 11-15/3 (7)	6-29	1-5	6,7	10,2	1,5	11-15/2 (14), 11-15/1 (9), 10/1 (8)	6-16	1-3	-	-	-	-	-	-
102	1,0	2,2	2,1	2/2 (52)	1-5	1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	1,0	1,8	1,9	2/2 (39)	1-3	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	1,1	2,1	1,9	2/2 (43)	1-4	1-4	1,3	1,8	1,4	2/1 (21), 2/2 (17), 1/1 (15)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
105	1,0	1,9	1,9	2/2 (44)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	1,0	3,7	3,5	4/4 (26), 3/3 (15)	2-6	2-5	1,1	3,1	2,8	3/3 (13), 2/2 (10), 4/3 (9)	2-7	1-4	-	-	-	-	-	-
107	1,4	6,7	4,9	7/5 (13), 6/5 (7), 6/4 (6), 7/4 (6)	4-9	2-7	1,1	2,1	1,9	2/2 (10), 4/4 (6)	2-6	1-5	-	-	-	-	-	-
108	1,1	2,1	2,0	2/2 (50)	2-4	1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	1,1	2,0	1,9	2/2 (44)	1-4	1-4	1,3	1,7	1,3	2/1 (24), 1/1 (17), 2/2 (16)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
110	1,0	2,0	1,9	2/2 (45)	1-3	1-2	1,1	1,7	1,6	2/2 (28), 1/1 (14), 2/1 (9)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
111	1,1	3,0	2,8	3/3 (26), 2/2 (14)	2-6	1-5	1,2	2,5	2,1	2/2 (18), 3/3 (13)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
112	5,6	11,1	2,0	11-15/2 (33), 10/2 (13), 9/2 (7)	7-15	1-3	-	-	-	-	-	-	8,9	15,0	1,7	11-15/2	9-21+	1-3

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
113	1,0	2,6	2,5	2/2 (35)	1-5	1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	1,1	2,0	1,9	2/2 (45)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	9,3	12,9	1,4	11-15/1 (17), 11-15/2 (11), 8/1 (9)	7-28	1-2	9,8	13,7	1,4	11-15/1 (21), 11-15/2 (10)	8-25	1-3	9,5	15,7	1,6	11-15/2	10-21+	1-3
116	0,8	2,2	2,6	2/2 (28), 2/3 (19)	1-4	2-4	1,0	1,9	2,0	2/2 (21), 1/1 (12), 2/3 (8), 2/1 (7)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
117	1,0	4,3	4,1	4/4 (15), 5/5 (14)	2-6	2-6	1,3	3,6	2,8	3/3 (10), 3/2 (9), 4/4 (7)	2-6	1-5	-	-	-	-	-	-
118	1,7	1,9	1,1	2/1 (40), 1/1 (10)	1-4	1-2	1,6	1,8	1,1	2/1 (26), 1/1 (23)	1-4	1-2	-	-	-	-	-	-
119	0,9	1,8	2,0	2/2 (40)	1-4	1-3	0,9	1,7	1,9	2/2 (24), 1/1 (13), 2/3 (8), 1/2 (7)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
120	3,0	10,6	3,5	11-15/4 (15), 11-15/3 (8), 9/4 (7)	6-23	2-5	-	-	-	-	-	-	3,3	9,8	3,0	11-15/4	6-10	1-4
121	1,2	3,2	2,8	3/3 (26), 4/3 (14)	2-6	2-3	7,5	16,8	2,3	16-20/2 (12), 11-15/2 (7), 11-15/1 (6)	8-32	1-6	-	-	-	-	-	-
122	1,1	2,0	1,9	2/2 (44)	1-3	1-3	1,2	1,6	1,4	1/1 (21), 2/2 (20), 2/1 (16)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
123	1,0	2,7	2,7	2/2 (30), 4/4 (11)	2-4	2-4	1,2	2,0	1,7	2/2 (23), 2/1 (13), 1/1 (9)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
124	0,7	2,5	3,5	2/4 (20), 2/3 (11)	2-4	2-4	0,7	1,7	2,5	2/3 (22), 2/2 (13), 1/1 (9)	1-3	1-4	-	-	-	-	-	-
125	1,0	2,0	1,9	2/2 (52)	1-4	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	5,4	21,0	3,9	21-30/4 (25), 16-20/4 (11)	7-33	1-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	1,0	2,0	2,0	2/2 (43)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	1,4	5,4	3,9	4/3 (12), 3/3 (7), 5/3 (5)	2-20	1-14	1,3	3,2	2,4	2/2 (11), 3/2 (10), 2/1 (8), 4/3 (8)	2-7	1-5	1,3	3,6	2,8	2/2	1-20	1-9
129	1,1	4,2	3,9	4/4 (23), 4/3 (10), 5/5 (10), 3/3 (5)	3-5	3-5	1,1	3,7	3,4	3/3 (11), 4/4 (10)	2-6	1-6	1,1	2,9	2,6	2/2	1-6	1-5
130	1,1	1,1	1,1	1/1 (52)	1-2	1-2	1,1	1,2	1,1	1/1 (48)	1-3	1-2	-	-	-	-	-	-
131	1,0	2,9	2,8	3/3 (32)	2-4	2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
132	1,0	1,9	1,9	2/2 (42)	1-5	1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
133	0,8	1,6	1,9	2/2 (28), 1/2 (24)	1-3	1-2	1,1	1,4	1,3	1/1 (34), 2/2 (11), 2/1 (10)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-

Versager an Tumorabklatschpräparaten

Fall- Nr.	FISH TAP						FISH TMA						FISH FFPE					
	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17	Ratio	øHER-2	øCEP17	häufigste Signalkombinationen	min.-max. HER-2	min.-max. CEP17
1	-	-	-	-	-	-	1,1	1,6	1,5	1/1 (16), 2/1 (16), 2/2 (15)	1-4	1-4	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	1,1	1,5	1,3	1/1 (27), 2/2 (14), 2/1 (13)	1-2	1-2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	1,2	2,3	2,0	2/2 (14), 1/1 (11), 3/2 (11)	1-5	1-4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	1,1	1,3	1,1	1/1 (46)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	0,9	1,7	2,0	2/2 (27), 1/1 (10), 2/3 (8)	1-3	1-4	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	1,0	1,5	1,6	1/1 (21), 2/2 (17), 1/2 (10)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	1,2	1,9	1,6	2/2 (18), 1/1 (15), 2/1 (13)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	1,3	2,1	1,6	2/2 (22), 2/1 (10), 1/1 (8), 3/1 (7)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	1,2	1,9	1,6	2/2 (21), 1/1 (17), 2/1 (8)	1-5	1-3	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	1,2	1,7	1,4	2/2 (21), 2/1 (19), 1/1 (16)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	1,0	1,6	1,6	2/2 (22), 1/1 (17), 2/1 (11)	1-2	1-3	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	1,0	1,5	1,4	1/1 (27), 2/2 (15), 2/1 (10)	1-3	1-3	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	1,2	1,7	1,5	1/1 (19), 2/2 (17), 2/1 (14)	1-4	1-3	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	1,2	1,7	1,5	2/1 (21), 2/2 (17), 1/1 (14)	1-3	1-4	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	1,3	2,0	1,6	2/2 (19), 1/1 (15), 2/1 (9), 3/1 (6)	1-5	1-3	-	-	-	-	-	-

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. med. Robert Emig danke ich für die Einführung in die Arbeitsmethode, die wertvolle Betreuung und die stets engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. med. Ulrich Vogel bedanke ich mich für die intensive Mitarbeit bei der Herstellung des Gewebemultiblocks, für die konstruktiven Vorschläge und wichtigen Hinweise bei der Umsetzung der Thematik.

Meiner Kommilitonin Frau cand. med. Sina Herzog möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Hella Böhner und Frau Grazyna Wroblewski aus dem histologischen Labor des Institutes für Pathologie an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen für die Anfertigung der Tumorabklatschpräparate.

Herrn Dr. rer. nat. Manfred Zwirner sowie den Mitarbeitern des Labors der Universitäts-Frauenklinik Tübingen danke ich für die Hilfe bei technischen Fragen und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen persönlichen Dank möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit stets mit viel Geduld und Fürsorge unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Regine Arnold
Geburtsdatum	22. Juni 1978
Geburtsort	Stuttgart
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung

1985 -1989	Grundschule Stuttgart Sillenbuch
1989 -1998	Evangelisches Heidehof-Gymnasium Stuttgart
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
30.08.2000	Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.03.2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
13.05.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
