

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie des
Universitätsklinikums Halle (Saale)**

(Direktor: Prof. Dr. med. habil. C. Thomssen)

**Nachweis des HER2-Status in Stanzbiopsie und
korrelierendem OP-Präparat bei Mammakarzinomen: Ein
Vergleich der drei etablierten Methoden (HercepTest™,
CISH, FISH)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Vera Wolf, geb. Spohn

geboren am 09.01.1981 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph Thomssen

Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen

Prof. Dr. med. Hans-Heinrich Kreipe (MH Hannover)

23.10.2012

06.05.2013

Referat und bibliographische Beschreibung

Einleitung: Es wurden bereits viele Studien zum Algorithmus der HER2 Bestimmung veröffentlicht. Aber nur eine multizentrische Studie hat sich mit der Verlässlichkeit aller drei etablierten Methoden bezüglich der beiden Gewebetypen beschäftigt. Wir haben die Ergebnisse der drei Methoden Immunhistochemie (IHC, HercepTest™), Fluoreszenz *in-situ* hybridisierung (FISH, Pathvysion®) und Chromogenic *in-situ* hybridisierung (CISH, ZytoDot SPEC) innerhalb eines Kollektives unserer Klinik für Stanzbiopsie und zugehöriges Resektat miteinander verglichen.

Methoden: Die Stanzbiopsie und das zugehörige Resektat von 222 Patienten mit Primärtherapie an unserer Klinik zwischen 01/03-06/08 wurden retrospektiv mittels IHC, FISH und CISH bezüglich dem HER2-Status analysiert.

Ergebnisse: Trotz der starken Korrelation zwischen Stanzbiopsie und Resektat mit der IHC (κ : 0,74) und den ISH (κ : 0,80-0,84), zeigt sich eine Tendenz über alle Methoden, dass das Resektatkollektiv mehr HER2 positive Fälle nachweist. Mittels zusätzlicher Analyse der IHC 2+ Fälle mit ISH fanden wir denselben Anteil (22/222) HER2 positiv bestätigter Fälle unter den IHC 2+/3+ Fällen im Stanzbiopsie- und Resektatkollektiv. Die Korrelation zwischen IHC und ISH fiel schlechter aus (κ : 0,66-0,73). 19-24% der IHC 3+ Ergebnisse waren ISH negativ. Dahingegen konnten wir eine gute Konkordanz (98%; κ : 0,90-0,92) zwischen CISH- und FISH-Ergebnissen nachweisen.

Schlussfolgerungen: Mit der IHC der Stanzbiopsie wurden alle HER2 positiven Fälle, die im Resektat bestimmt wurden, detektiert. Dies unterstützt die Zuverlässigkeit der Bestimmung des HER2 Status anhand der Stanzbiopsie. Demgegenüber zeigt die Bestimmung mit der ISH im Resektat Vorteile aufgrund des größeren Ausschnittes des Tumors. Die IHC korrelierte mit der ISH nicht ausreichend, um den IHC 3+ und 0/1+ Fällen alleinig vertrauen zu können. Da die CISH-Ergebnisse mit denen der FISH gut übereinstimmten, sollte die CISH besser als die FISH zur HER2 Bestimmung geeignet sein, da sie weniger teuer und aufwendig ist.

Wolf, Vera: Nachweis des HER2-Status in Stanzbiopsie und korrelierendem OP-Präparat bei Mammakarzinomen: Ein Vergleich der drei etablierten Methoden (HercepTest™, CISH, FISH).

Halle an der Saale, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2012

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Der Humane Epidermale Growth Factor Receptor HER 2.....	2
1.2.1 Nomenklatur.....	2
1.2.2 Funktion.....	2
1.2.3 Überexpression und Genamplifikation.....	5
1.2.4 Testalgorithmus.....	6
1.2.5 Prädiktiver und prognostischer Wert.....	8
1.3 Therapie HER2 positiver Mammakarzinome.....	8
1.3.1 Trastuzumab.....	9
1.3.2 Lapatinib.....	10
1.3.3 Therapieresistenz.....	11
1.3.4 Neue Therapieoptionen – Zukunft.....	11
1.4 Zielstellung	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Tumorkollektiv.....	13
2.2 Zusammensetzung des Kollektives.....	14
2.3 Labormaterialien	16
2.3.1 Chemikalien, Antikörper und Kits	16
2.3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.4 Immunhistochemie Östrogenrezeptor SP1 und Progesteronrezeptor SP2 (Lab Vision Corporation)	19
2.4.1 Grundlagen.....	19
2.4.2 Durchführung und Auswertung.....	19
2.5 Immunhistochemie - HercepTest™(DAKO)	20
2.5.1 Grundlagen.....	20
2.5.2 Durchführung und Auswertung.....	21
2.6 CISH - Chromogen <i>In Situ</i> Hybridisierung - Zyto Dot SPEC HER2 Probe Kit (ZYTOMED-SYSTEMS).....	22
2.6.1 Grundlagen.....	22
2.6.2 Durchführung und Auswertung.....	23

2.7	FISH - Fluoreszenz <i>In Situ</i> Hybridisierung – HER-2 DNA Probe Kit (PathVysion Kit, Abbott).....	26
2.7.1	Grundlagen.....	26
2.7.2	Durchführung und Auswertung.....	26
2.8	Auswertung und Statistik.....	27
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Korrelation der Steroidrezeptor-Ergebnisse von Stanze und Resektat	29
3.1.1	Korrelation des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und OP-Resektat	31
3.2	Korrelation der HER2-Ergebnisse von Stanze und Resektat.....	32
3.2.1	Korrelation des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™	32
3.2.2	Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH.....	36
3.2.3	Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH	38
3.3	Vergleich der Methoden jeweils miteinander.....	39
3.3.1	Vergleich des HercepTest™ mit der CISH der Stanzbiopsie	39
3.3.2	Vergleich des HercepTest™ mit der FISH der Stanzbiopsie.....	41
3.3.3	Vergleich des HercepTest™ mit der CISH des Resektates	42
3.3.4	Vergleich des HercepTest™ mit der FISH des Resektates.....	43
3.3.5	Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie	44
3.3.6	Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH des Resektates	45
3.3.7	Weitere Assoziation des HER2-Status/Sonderfälle.....	46
4	DISKUSSION	48
4.1	Aktueller Testalgorithmus HER2.....	48
4.2	Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen.....	50
4.2.1	Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich des HercepTest™	51
4.2.2	Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der CISH - Methode	53
4.2.3	Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der FISH Methode	53
4.2.4	Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der Steroidrezeptoren	54
4.2.5	Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden.....	55
4.2.6	Vergleich CISH mit FISH.....	56
4.2.7	HercepTest™, CISH und FISH.....	58
4.2.8	HER2 negative Sonderfälle	59
4.2.9	Ausblick	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	6
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
7	THESEN.....	79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1	Aufbau von HER 2 nach Stryer, L.: Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 5. Auflage, 1035, (1990).....	3
Abbildung 1-2	Die HER Familie mit entsprechenden Liganden nach http://www.epgonline.org/images/nclc/2022_01.gif	4
Abbildung 1-3	HER 2 pathways nach Park, J.W., Neve, R.M., Szollosi, J. & Benz, C.C. (2008). Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. <i>Clin Breast Cancer</i> , 8, 392-401 und Meric-Bernstam, F. & Hung, M.-C. (2006). Advances in Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling for Cancer Therapy 10.1158/1078-0432.CCR-06-1732. <i>Clinical Cancer Research</i> , 12, 6326-6330.....	5
Abbildung 1-4	Testalgorithmus HER2 nach Wolff et al., 2007[45].....	6
Abbildung 2-1	Charakteristische Darstellung der immunhistochemischen Anfärbung der Mammakarzinomzellen A HercepTest™ Score 0, B HercepTest™ Score 1+, C HercepTest™ Score 2+, D HercepTest™ Score 3+.....	22
Abbildung 2-2	Charakteristische Darstellung der Anfärbung der HER2 Signale im Zellkern mittels CISH, A Mammakarzinomzellen mit im Durchschnitt 2 Signalen = HER2 nicht amplifiziert, B Mammakarzinomzellen mit > 5 HER2- Signalen = HER2 amplifiziert, z.T. Clusterbildung.....	25

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1	Zusammensetzung des Kollektives.....	14
Tabelle 2-2	Verteilung des pT-Status des Kollektives nach (UICC Sobin LH, 2002).....	15
Tabelle 2-3	Verteilung des pN-Status im Kollektiv nach Singletary et al. 2002.....	15
Tabelle 2-4	Verteilung des Grading innerhalb der Resektate nach Elston & Ellis (Elston & Ellis, 1991); G = Grading.....	15
Tabelle 2-5	Verteilung des histologischen Subtypes innerhalb der Resektate.....	16
Tabelle 2-6	Chemikalien, Antikörper und Kits.....	16
Tabelle 2-7	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 2-8	Immunreaktiver Score Hormonrezeptoren nach Remmele, W. & Stegner, H. (1987) (Remmele & Stegner, 1987).....	20
Tabelle 2-9	Bewertungskriterien nach DAKO zur Bestimmung des HER2 Status mit dem HercepTest™(nach http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=120856004).....	21
Tabelle 3-1	Korrelation des Östrogenrezeptor(ER)-Status von Stanze und Resektat.....	29
Tabelle 3-2	Übereinstimmung des Östrogenrezeptor(ER)-Status von Stanze und OP-Resektat.....	29
Tabelle 3-3	Darstellung der Fälle Stanze ER negativ/OP ER positiv mit PgR (n=2).	30
Tabelle 3-4	Darstellung der Fälle Stanze ER positiv/OP ER negativ mit PgR (n=11)	30
Tabelle 3-5	Korrelation des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und Resektat.....	31
Tabelle 3-6	Übereinstimmung des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und OP-Resektat.....	31
Tabelle 3-7	Darstellung der Stanzbiopsie- Fälle ER negativ/PgR positiv (n=3).....	32
Tabelle 3-8	Darstellung der Resektatfälle-Fälle ER negativ/PgR positiv (n=8).....	32
Tabelle 3-9	Korrelation des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™.....	33
Tabelle 3-10	Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™.....	33
Tabelle 3-11	Korrelation des kategorialen HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™ (neg = 0; 1+; äqu = 2+; pos = 3+).....	33
Tabelle 3-12	Übereinstimmung des kategorialen HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™.....	33
Tabelle 3-13	Anteile Ergebnisse HercepTest™ in Stanze und Resektat (neg = 0; 1+; äqu = 2+; pos = 3+).....	34
Tabelle 3-14	Darstellung der diskordanten Fälle bei Korrelation HercepTest Stanze vs. Resektat aus Tabelle 3-11 mit mindestens einem positivem ISH-Ergebnis (n=4).....	34
Tabelle 3-15	Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™.....	35
Tabelle 3-16	Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™.....	35
Tabelle 3-17	Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status von Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels HercepTest™.....	36
Tabelle 3-18	Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH.....	36
Tabelle 3-19	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-18 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH (n=7).....	36
Tabelle 3-20	Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH.....	37
Tabelle 3-21	Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status der Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels CISH.....	37
Tabelle 3-22	Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH.....	38
Tabelle 3-23	Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH.....	38
Tabelle 3-24	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-22 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH (n=9).....	38

Tabelle 3-25	Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status der Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels FISH.....	39
Tabelle 3-26	Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH der Stanzbiopsie.....	39
Tabelle 3-27	Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH der Stanzbiopsie.....	40
Tabelle 3-28	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-27 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit CISH der Stanzbiopsie (n=13).....	40
Tabelle 3-29	Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie.....	41
Tabelle 3-30	Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie.....	41
Tabelle 3-31	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-30 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie (n=10)....	41
Tabelle 3-32	Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates.....	42
Tabelle 3-33	Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates.....	42
Tabelle 3-34	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-33 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates (n=13).....	42
Tabelle 3-35	Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates.....	43
Tabelle 3-36	Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates.....	43
Tabelle 3-37	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-36 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates (n=16).....	43
Tabelle 3-38	Assoziation des HER2 Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie.....	44
Tabelle 3-39	Übereinstimmung des HER2 Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie.....	45
Tabelle 3-40	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-38 Assoziation des HER2 Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie (n=4).....	45
Tabelle 3-41	Assoziation des HER2 Status mittels CISH und FISH des Resektates.....	45
Tabelle 3-42	Übereinstimmung des HER2 Status mittels CISH und FISH des Resektates.....	45
Tabelle 3-43	Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-42 Assoziation des HER2 Status mittels CISH und FISH des Resektates (n=4).....	46
Tabelle 4-1	Studienergebnisse mit Vergleich von CISH und FISH.....	56

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

AKT	Proteinkinase B (AKT)
äqu	äquivok
ASCO	American Society of Clinical Oncology
Bad	BCL2-associated antagonist of cell death
Bcl-X	BCL-related protein
BT Puffer	0.1M Natriumhydrogencarbonat, Trinatriumcitrat, 0.05 % Tween20
CAP	College of American Pathologists
caspase	apoptosis-related cysteine peptidase
CEP17	Centromer Enumeration Probe Chromosom 17 (17p11.1-q11.1)
c-erbB2	andere Bezeichnung für HER2
CISH	Chromogen <i>in situ</i> Hybridization
cMyc	Transkriptionsfaktor cellular myc Protein: Benennung aufgrund der Ähnlichkeit mit viralem Myelocytomatose-Onkogen (<i>v-myc</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI bindet an A=T reiche Abschnitte in den Chromosomen. Es zeigt unter Ultraviolett Licht eine Fluoreszenz
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonucleic acid
ECD	extracellular domain of HER2, auch p95 genannt
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Andere Bezeichnung für HER1, Epidermal Growth Factor Receptor
ELK	Mitglied der Ets-Onkogen-Familie
ER	Estrogen Receptor, Östrogenrezeptor
Ets	Transkriptionsfaktor: erythroblastosis virus E 26 oncogene
Fas- L	Fas-Ligand (TNF superfamily)
FDA	Food and Drug Administration (Behördliche Lebensmittelüberwachung und die Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika)
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
Fos	Nukleäres Phosphoprotein, Onkogen
Grb2	Growth factor receptor bound protein: an den tyrosylierten Wachstumsfaktorrezeptor bindendes Protein, kann darüber Sos binden und translozieren, somit auf den RAS Signalweg wirken.
ges.	gesamt
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER1	Human Growth Factor Receptor 1, humaner Wachstumsfaktorrezeptor 1, auch für die Bezeichnung des kodierenden Gens gebraucht.
HER2	Human Growth Factor Receptor 2, humaner Wachstumsfaktorrezeptor 2, auch für die Bezeichnung des kodierenden Gens gebraucht.
HER-2/neu	andere Bezeichnung für HER2
HER2/CEP17-Ratio	Quotient aus HER2 Signalen und Chromosom 17 Signalen in den Zellkernen
HER3	Human Growth Factor Receptor 3, humaner Wachstumsfaktorrezeptor 3, auch für die Bezeichnung des kodierenden Gens gebraucht
HER4	Human Growth Factor Receptor 4, humaner Wachstumsfaktorrezeptor 4, auch für die Bezeichnung des kodierenden Gens gebraucht
HRP	Horseradishperoxidase, Meerrettichperoxidase

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

IGF1R	Insulin like Growth Factor 1 Receptor
IHC	Immunhistochemie
IKK	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IRS	Immunreaktiver Score
ISH	<i>In Situ</i> Hybridization
I κ B	NF-kappa-B inhibitor
JUN	Protoonkogen: v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Map Kinase
MEKK	MAP Kinase Kinase
Min	Minuten
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MUC4	Mucin 4, membranäres Glykoprotein
neg	negativ
NF- κ B	Nuclear factor κ B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NOS	not otherwise specified
OP	Operation
p21	activated kinase
p27 ^{Kip1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
p53	Zelluläres Tumorsuppressor Protein
p95	Extrazelluläre Domäne von HER2
PBS	Phosphat Buffered Saline
PgR	Progesteronrezeptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pos	positiv
PP	Prozentsatz positiver Zellkerne
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
Raf-1	Serin/Threonin Protein Kinase-raf-1, murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ras	GTPase-viral oncogene from the rat derived Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses
SAPK	mitogen-activated protein kinase-9
Shc	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1, Tyrosinkinase mit Homologie zu Srcmitogen-activated protein kinase 9
SI	Stain Intensity, Färbungsintensität
SISH	Silver-enhanced In Situ Hybridization
SOS	son of sevenless homolog 1, dieses Protein initiiert den Austausch von an RAS gebundenem GDP durch GTP
Sp1	Sp1 Transkriptionsfaktor von sevenless homolog 1
Src	Tyrosinkinase, deren Prototyp im Retrovirus Rous Sarcoma Virus identifiziert wurde, zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma
SSC	Saline Sodium Citrat
TBS-Puffer	Tris Buffered Saline
TGF α	Transforming Growth Factor α
TK	Tiefkühlfrost gelagert
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiy)- Monododekansäure-Sorbitylester, ein nichtionischer Polyoxyethylen Surfactant, verhindert die unspezifische Bindung bei Immunoassays

1 EINLEITUNG

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (2004: 27,8 %) mit prognostisch 74500 Neuerkrankungen 2012 in Deutschland. Durchschnittlich jede 8. Frau erkrankt in ihrem Leben an Brustkrebs. Erschwerend kommt hinzu, dass das Mammakarzinom gleichzeitig mit anteilig 18 % die häufigste Todesursache in der Gruppe der malignen Tumoren bei Frauen ist [1-3]. Die Inzidenz ist seit 1980 leicht angestiegen. Dabei sinken die Rezidiv- und Mortalitätsrate geringfügig. Ursächlich wird diese Entwicklung als Folge der optimierteren Präventions- und Therapiemaßnahmen vermutet. Die 2008 vom Robert Koch-Institut geschätzte relative 5 Jahres-Überlebensrate beträgt 86 % .

In der Diagnostik des Mammakarzinoms kommen verschiedene Methoden wie die klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren und letztlich die bioptische Sicherung zum Einsatz. Neben der histologischen Sicherung werden dabei auch prognostische und prädiktive Faktoren bestimmt. Die Stanzbiopsie ist zur Diagnosesicherung des Mammakarzinoms unerlässlich. Die Ergebnisse der gewonnenen Gewebeprobe sollten trotz des zumeist geringen Anteils am Gesamttumor zuverlässig sein, da das weitere therapeutische Vorgehen von ihnen abhängt. Insbesondere bei einem neoadjuvanten Therapieansatz ist dies enorm wichtig, auch weil dies wegen der zunehmenden Bestrebung brusterhaltend zu therapieren, immer mehr zum Einsatz kommt. Beim Eintreten einer kompletten Remission infolge einer neoadjuvanten Therapie bietet das Stanzgewebe die einzige Möglichkeit, die Tumoreigenschaften zu definieren. Wenngleich eine Änderung des Tumorprofils im Therapieverlauf nicht auszuschließen ist. Außerdem könnte die Stanze potentiell bessere Aussagen über Tumoreigenschaften bieten, da eine leichtere und damit auch bessere Fixierung des Stanzgewebes diskutiert wird [4, 5]. Natürlich ist auch eine komplette Entfernung des Tumors durch die Stanze möglich. Somit ist die histopathologische Diagnostik anhand der Stanzbiopsie maßgebend für die Therapieentscheidung.

Zahlreiche Prognoseparameter können aus dem entnommenen Tumorgewebe ermittelt werden. Dazu zählen unter anderem die Tumorgöße, der Nodalstatus, das Grading, der Hormonrezeptorstatus, der HER2-Status, das Vorliegen von Metastasen, uPA/PAI-1 und bestimmte Marker der Zellteilungsaktivität wie Ki-67.

Neue Parameter der Forschung sind beispielsweise GLI1 (glioma-associated oncogene homolog 1), Cyclin D1b und p53 Mutationen. Auch Genexpressions-Profiltests wie MammaPrint® (http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K070675.pdf) oder Oncotype DX® (<http://www.genomichealth.com>) spielen zunehmend eine Rolle [6-8].

Dabei ist ein Prognosefaktor ein Parameter, der zum Diagnose- oder Operationszeitpunkt mit dem Gesamtüberleben, das heißt dem Auftreten eines Rezidivs oder einer Metastasierung korreliert. Dagegen ist ein prädiktiver Faktor mit dem Ansprechen auf eine Therapie assoziiert [9]. Jedoch kann auch ein Prognoseparameter einen prädiktiven Wert haben. Da beide Definitionen nicht immer klar voneinander zu trennen sind, ist davon auszugehen, dass die Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 neben der Prädiktion des Therapieansprechens auf Trastuzumab auch eine a priori ungünstigere Prognose anzeigt [9-11].

1.2 Der Humane Epidermale Growth Factor Receptor HER 2

1.2.1 Nomenklatur

Bei etwa 10 – 15 % aller Mammakarzinome kann eine Amplifikation des HER2-Gens oder eine Überexpression des HER2-Proteins nachgewiesen werden. Das HER2/neu Gen wurde erstmals durch Shih et al., 1981 beschrieben [12]. Der Zusatz neu stand dabei für den Nachweis in Neuroglioblastoma von Ratten und wurde zum Teil auch zur Bezeichnung des Gens gebraucht. Durch die weitere Forschung gelangte man zur Erkenntnis, dass dieses Gen eine große Ähnlichkeit mit dem EGFR (HER 1) hat, welches den Epidermalen Growth Factor Receptor kodiert [13-16]. Ebenso wurde entdeckt, dass HER2 große Homologie mit dem Transformationsgen des Erythroblastosevirus der Vögel zeigt. Daher stammt die Bezeichnung c-erbB2 [17]. Da verschiedene Arbeitsgruppen parallel an der Charakterisierung von HER2 beteiligt waren, erklärt sich auch die Vielzahl an Bezeichnungen, wobei „HER2“ aktuell die Gebräuchlichste ist.

1.2.2 Funktion

Das menschliche HER2-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17q12-21.32 [18, 19]. Das Gen kodiert für ein 185 kDa Transmembran-Glykoprotein (p185) mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, welches der Familie der EGFR (epidermal growth factor receptor) zugeordnet wurde. Zu dieser Familie homologer

Membranrezeptoren mit intrazytoplasmarer Tyrosinkinaseeinheit gehören außerdem der schon genannte EGFR (HER1), HER3 und HER4.

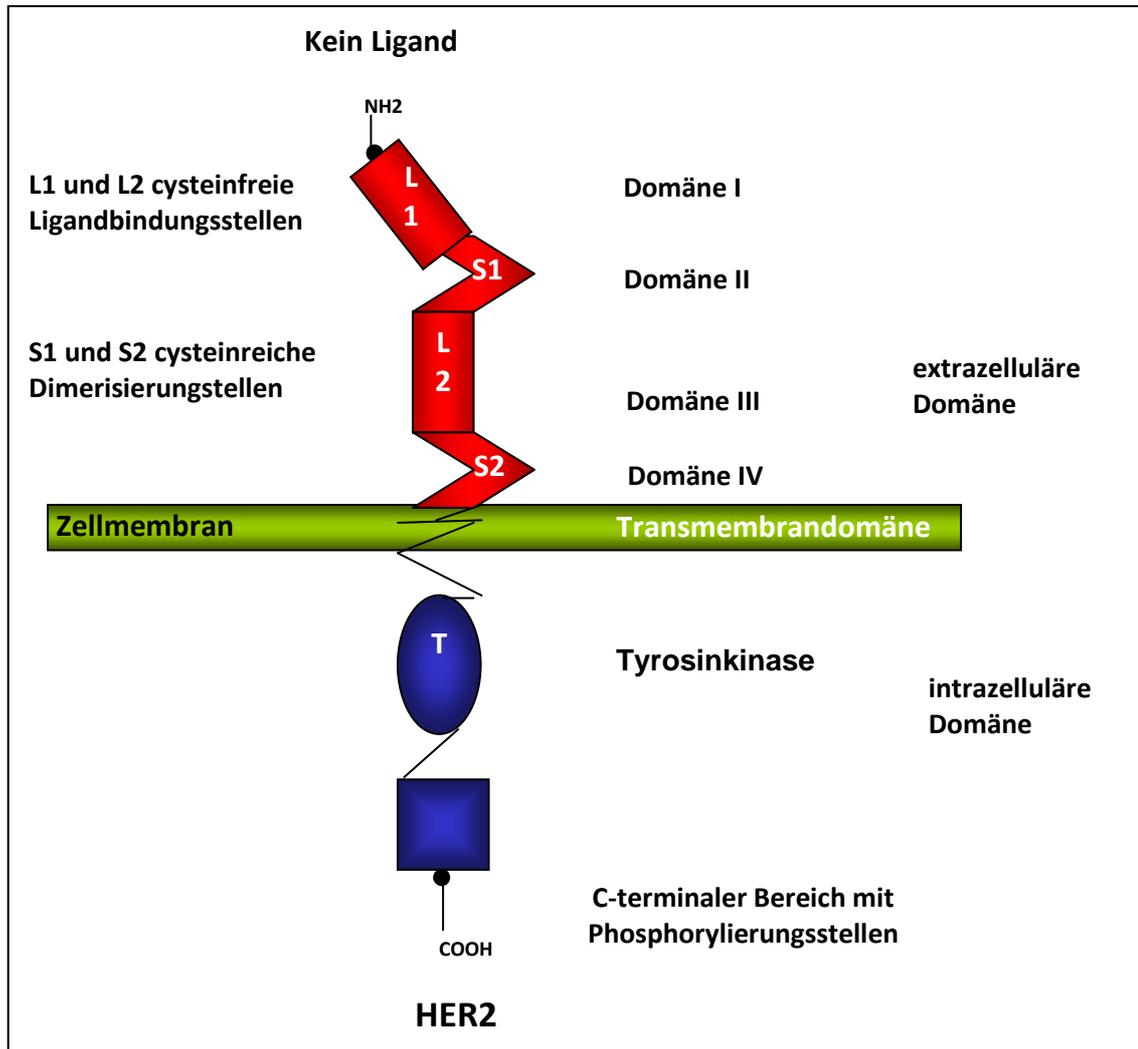


Abbildung 1-1 Aufbau von HER 2 nach Stryer, L.: *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 5. Auflage, 1035, (1990).

HER2 besteht aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne, welche mittels einer Transmembrandomäne verbunden sind wie in Abbildung 1-1 dargestellt. Die extrazelluläre Einheit besteht aus zwei cysteinfreien Ligandenbindungsstellen und zwei cysteinreichen Dimerisierungsabschnitten. Diese Einheiten werden fortlaufend auch als Domäne I-IV klassifiziert. Der intrazelluläre Anteil besteht aus einer Tyrosinkinaseeinheit mit C-terminalen Phosphorylierungsstellen.

Die Bindung eines extrazellulären Liganden führt zur Bildung von Hetero- oder Homodimeren, aktiviert so die intrazelluläre Tyrosinkinase, welche dann spezielle Zielproteine phosphoryliert und darüber Signalkaskaden wie in Abbildung 1-1 dargestellt, initialisiert. Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren werden durch Anlagerung von Liganden (beispielsweise EGF, TGF α , Heregulin) an die

Zellmembran reguliert: Abbildung 1-2 [19, 20]. Lediglich für HER2 konnte bis heute kein spezifischer Ligand gefunden werden, so dass man davon ausgeht das er keinen eigenen Liganden besitzt [21]. Bei HER3 fehlt dagegen die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität [22]. HER2 entfaltet seine Wirkung durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit sich selber oder den anderen HER. Dabei ist HER2 der bevorzugte Bindungspartner der anderen HER-Rezeptoren, weil HER2 im Gegensatz zu den anderen immer in der offenen Bindungskonfiguration vorliegt (Domaine II ist immer zur Dimerisierung bereit), welche die anderen erst nach Ligandenanlagerung zeigen [23, 24]. Außerdem sind die mit HER2 gebildeten Dimere in ihrer Signalstärke den anderen Komplexen überlegen [25].

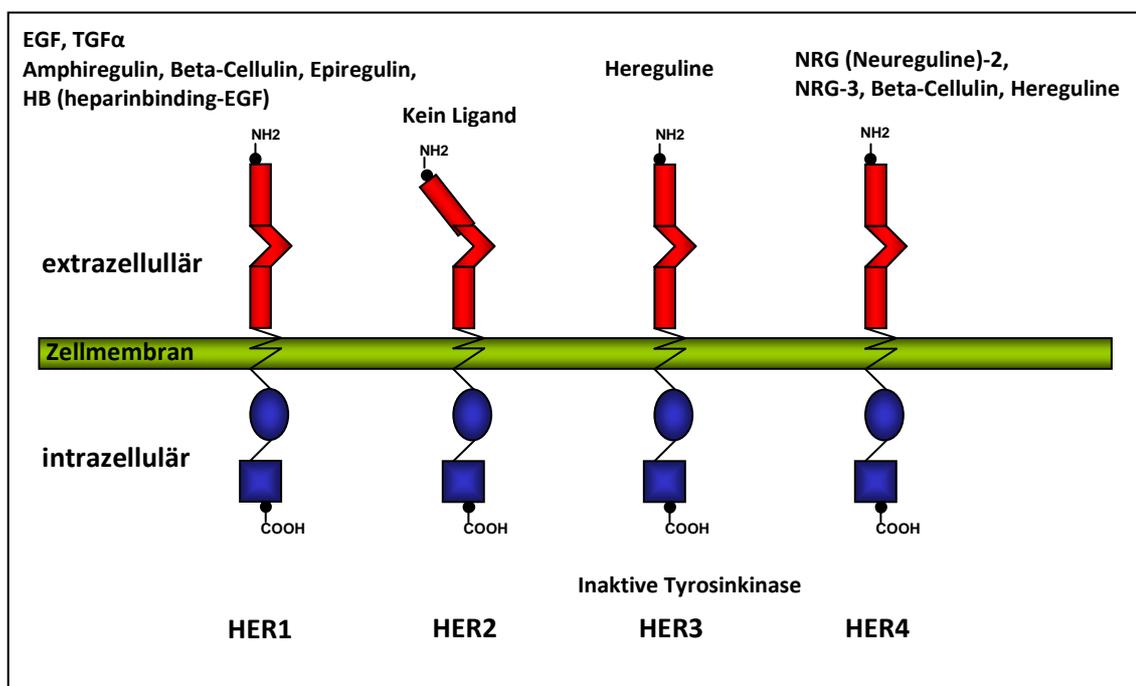


Abbildung 1-2 Die HER Familie mit entsprechenden Liganden nach http://www.epgonline.org/images/nclc/2022_01.gif.

Nach Dimerisierung kommt es zu einer Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase gefolgt von einer Initialisierung verschiedenster Signalkaskaden: Abbildung 1-3 [23, 26, 27]. An die phosphorylierte Bindungsstelle können sich bestimmte Proteine wie Grb2, Shc, Src und PI3K anlagern, welche den MAPK oder AKT-Pfad initialisieren [28]. Die HER2-Aktivierung führt zu Zellwachstum. Während der Embryogenese ist HER2 an der Brustentwicklung, somit insbesondere an der Zelldifferenzierung beteiligt. Darüber hinaus verhindert die HER2-Überexpression die Induktion von Apoptose der Zelle. Bei übermäßiger Aktivierung fördert HER2 die maligne Transformation, die Invasion (Adhäsion,

Migration), die Metastasierung und die Angiogenese (VEGF wird hochreguliert) der Zellen [29, 30].

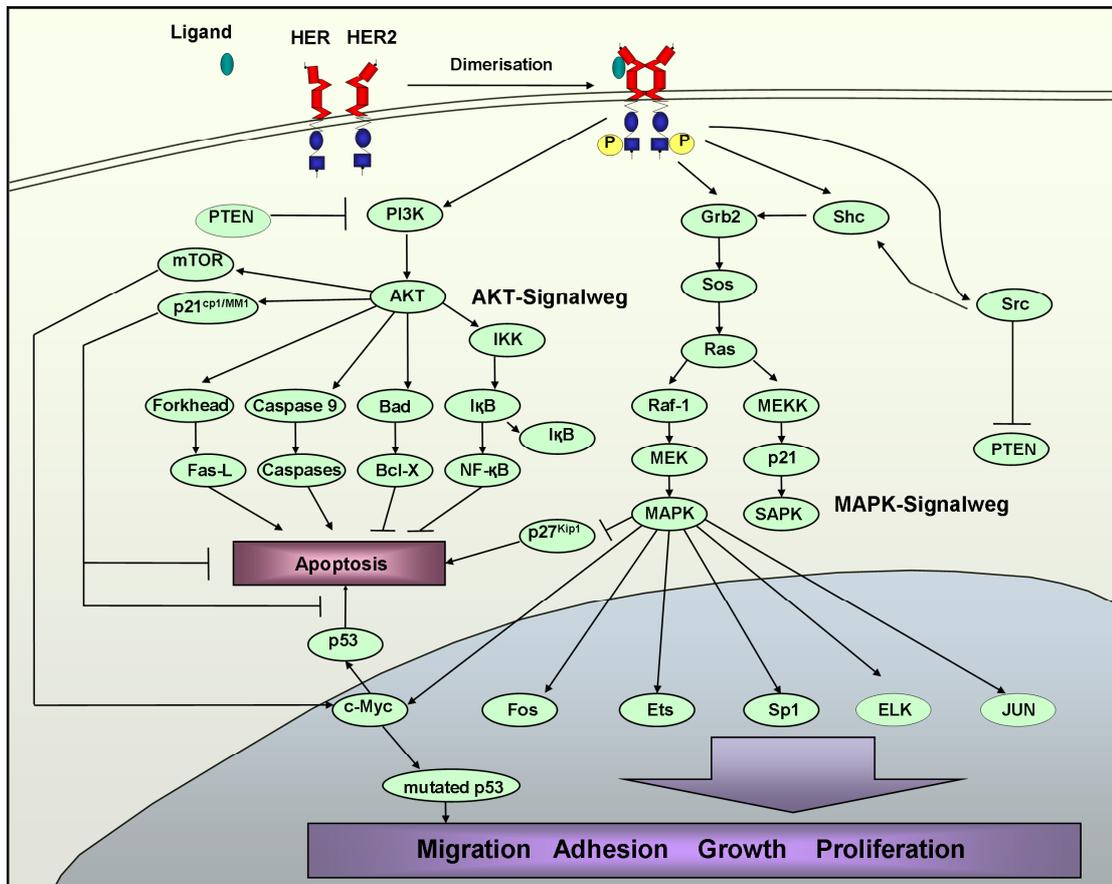


Abbildung 1-3 HER 2 pathways nach Park, J.W., Neve, R.M., Szollosi, J. & Benz, C.C. (2008). Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer*, 8, 392-401 und Meric-Bernstam, F. & Hung, M.-C. (2006). Advances in Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling for Cancer Therapy 10.1158/1078-0432.CCR-06-1732. *Clinical Cancer Research*, 12, 6326-6330.

1.2.3 Überexpression und Genamplifikation

Entsprechend seiner Funktion handelt es sich demnach bei dem HER2-Gen um ein Protoonkogen, da dessen übermäßige Aktivierung an der Tumorigenese von Zellen beteiligt sein kann. Dabei geht man von einer verstärkten und verlängerten Signaltransduktion von zur Tumorentwicklung beitragenden Transmittern [20], einem verstärktem Recycling von HER2 assoziierten Dimeren mit Präsentation an der Zellmembran und einer ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung [31] aus.

HER2 ist in ca. 10-15 % der invasiven Mammakarzinome überexprimiert [32-34]. Beim DCIS wird der Anteil der überexprimierenden Zellen sogar mit 40-60 % angegeben [35, 36]. In der Arbeit von Roses et al. (2009) korrelierte eine HER2 Überexpression im DCIS mit dem Vorliegen invasiver Foci. Dies spricht für die

bedeutende Rolle von HER2 bei der Tumorigenese [36]. Gegenteilige Ergebnisse lassen hier keine abschließende Bewertung zu [37, 38].

Eine Überexpression von HER2 im Bereich der Zellmembran konnte beispielsweise auch bei Magen-, Ovarial-, Harnblasen-, Pankreas-, Lungen- und Gallenblasenkarzinomen festgestellt werden [39]. Dabei ist das Protein bis zu 100fach gegenüber dem Normzustand exprimiert [40]. Diese Überexpression wurde wiederum auf eine Amplifikation des HER2-Gens zurückgeführt, da dies stark miteinander korreliert [41, 42]. Jedoch sind auch Fälle bekannt, bei denen trotz eindeutiger Proteinüberexpression keine Genamplifikation nachgewiesen werden konnte und *vice versa* [43, 44]. Eine HER2 Überexpression lässt sich außerdem u.a. auf der Zellmembran von Kardiomyozyten und benignen Mammaepithelzellen nachweisen.

1.2.4 Testalgorithmus

Der genaue Algorithmus zur Bestimmung von HER2 ist aktuell wie in **Abbildung 1-4** dargestellt festgelegt.

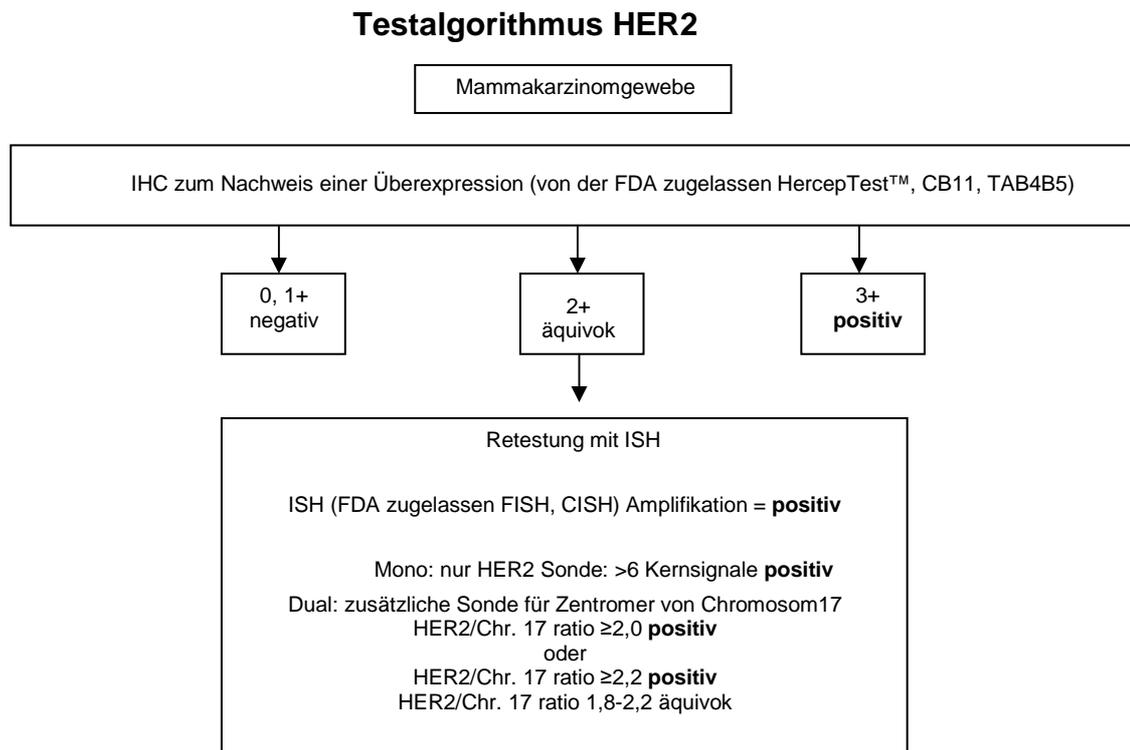


Abbildung 1-4 Testalgorithmus HER2 nach Wolff et al., 2007[45].

Der positive HER2-Status ist aktuell definiert bei Vorliegen einer immunhistochemischen Überexpression von 3+ nach DAKO Score [45, 46].

Von der FDA zugelassene Antikörper zur Durchführung der Immunhistochemie sind dabei:

- 1) DAKO HercepTest™, Dänemark,
- 2) BioGenex InSite™ Her-2/neu Mouse Monoclonal Antibody (Clone CB11) kit, BioGenex Laboratories, Inc., Norris, CA;
- 3) PATHWAY™ HER2 (Clone CB11), mouse monoclonal antibody, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ;
- 4) PATHWAY® anti-HER-2/Neu (4B5), rabbit monoclonal antibody, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ.

Auch der Nachweis der Amplifikation des HER2-Gens mittels ISH ist zum Nachweis eines positiven HER2-Status möglich. Hierbei sind von der FDA zugelassen:

- 1) FISH mit DakoCytomation HER2 FISH pharmDx™ Kit, Dänemark,
- 2) FISH mit PathVision®- HER2/neu-DNA- Sonden Kit, Abbott, USA
- 3) CISH von SPOT-Light® HER2 CISH™ Kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA.
- 4) CISH mit HER2 CISH pharmDx(TM) Kit, DAKO, Dänemark

Diesbezüglich fällt auf, dass eine Vielzahl von Antikörpern und DNA-Sonden existieren, die ebenfalls eine gute Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit aufweisen, jedoch keine generelle Empfehlung erhalten [47].

Bei Vorliegen eines IHC 2+ Ergebnisses ist generell der Nachweis einer Amplifikation von HER2 mittels ISH zusätzlich notwendig. Die ASCO-CAP Leitlinien verlangen erst die Durchführung der IHC und lediglich bei IHC 2+ Ergebnis die zusätzliche Durchführung einer ISH [45].

Schwach positiv exprimierte Fälle (IHC 2+, äquivok) zeigen häufig eine Polyploidie des Chromosom 17, welche mittels Dual In Situ Hybridisierung mit einer zusätzlichen Sonde für das Zentromer von Chromosom 17 nachgewiesen werden kann. Überwiegt der Einfluss der Polyploidie gegenüber der HER2-Amplifikation ($\text{HER2/CEP17-Ratio} < 2,0$, bzw. $< 1,8$) ist von einem negativen HER2-Status auszugehen. Erlangt man ein äquivokales Ergebnis in der ISH, empfiehlt sich die Auswertung zusätzlicher Zellen oder die Retestung. Zusammenfassend zeigt sich dabei die Notwendigkeit der permanenten Qualitätssicherung der HER2-Bestimmung. Dies muss intern durch mitgeführte Referenzproben und randomisierte Mehrfachbestimmung von unterschiedlichem Tumormaterial wie bei heterogenen Tumoren generell empfohlen, umgesetzt werden. Zusätzlich sollte aber eine Teilnahme der Institute an Ringversuchen oder bei Bedarf eine Fremdbestimmung zur Zweitmeinung erfolgen.

1.2.5 Prädiktiver und prognostischer Wert

Die Überexpression von HER2 geht mit einer schlechteren Prognose einher [33, 48-50]. Es ist noch immer umstritten, ob es sich dabei lediglich um einen Prognosefaktor bei nodalpositiven Patienten handelt oder ob dies auf alle HER2 positiven Patienten zutrifft [51-54]. Die meisten Studien gehen jedoch auch von einer generell schlechteren Prognose HER2 positiver Tumoren aus [49, 55-58]. HER2 Positivität wird häufiger bei größeren Tumoren, Lymphknotenbefall, höherem Grading, sowie verminderter Expression von Steroidrezeptoren gefunden [59-61]. Wobei andere Publikationen die Unabhängigkeit von Tumorgröße, Grading, Nodalstatus oder Patientenalter proklamieren [62-64]. Bei positivem HER2-Status findet man anteilig vermehrt die Entwicklung von Hirnmetastasen (in 25-48 %). Dies kann Folge der generell größeren Aggressivität als auch der Akzeptanz der Blut-Hirn Schranke der Therapeutika sein [65-67]. Zusätzlich hat HER2-Positivität einen prädiktiven Charakter, beispielsweise hinsichtlich des positiven Ansprechens auf bestimmte Chemotherapien (vermehrtes Anthrazyclinansprechen, vermutlich durch Nachbarschaft vom Topoisomerase II alpha- Gen bei gleichzeitiger Amplifikation [68]) und natürlich für die zielgerichtete Therapie mittels Trastuzumab und Lapatinib. Hinsichtlich einer antihormonellen Therapie (Tamoxifen) wird ein vermindertes Ansprechen bei HER2 und Hormonrezeptor positiven Patienten vermutet [34, 69-73], da die Aktivierung von HER2 über p38 (MAPK pathway) eine übermäßige Aktivierung des ER zur Folge haben kann [52, 74-76]. Bei Aromatasehemmern gibt es dazu widersprüchliche retrospektive Ergebnisse. Zum einen wurde ein besseres Ansprechen der speziellen Kohorte im Vergleich zu Tamoxifen gezeigt [77], andererseits gab es widersprüchliche klinische Ergebnisse, die keinen Unterschied nachweisen konnten [78, 79]. Man wird weitere prospektive Resultate abwarten müssen, um eine Klärung zu erreichen [80].

Zusammenfassend wird für HER2 ein prädiktiver Wert vermutet, klinisch relevant ist dies aber bis dato nur für die Behandlung mit anti-HER2 Wirkstoffen (Trastuzumab, Lapatinib etc.)[9].

1.3 Therapie HER2 positiver Mammakarzinome

Mit der Charakterisierung des HER2-Epitops wurde die Möglichkeit für eine zielgerichtete Therapie entwickelt. Wenn Tumorzellen HER2 als Ziel (target) überexprimieren, werden aufgrund der spezifischen Blockade der dadurch gestörten Signalkaskade diese Tumorzellen in ihrem Wachstum gehemmt und gegebenenfalls zerstört. Durch diese zielgerichtete Therapie konnte die Prognose insgesamt

deutlich verbessert werden. Man geht von weniger systemischen Nebenwirkungen des Medikaments aus, da die Proteine, ihre Wirkung nur dort entfalten, wo HER2 vorkommt.

1.3.1 Trastuzumab

Als erstes HER2 zielgerichtetes Medikament wurde Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech, South San Francisco, CA) (1998 in USA, 2000 in Deutschland) zugelassen. Es handelt sich dabei um einen humanisierten rekombinanten monoklonalen 150 kDa Antikörper, welcher kompetitiv an die Extrazellulärdomäne des HER2-Rezeptors bindet [81]. Trastuzumab blockiert dadurch die Bildung von Dimeren, vermindert damit die Signalweitergabe und führt zur Immunreaktion mit folgender Zytolyse sowohl durch Aktivierung der zellulären Immunität [82] als auch durch eine komplementabhängige Immunreaktion gegen die Zelle [83]. Es veranlasst über p27Kip1 und p21 einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase und damit die Apoptose der Zellen [84]. Über die verstärkte Aktivität von PTEN wird der PI3K pathway gehemmt. Der HER2-Rezeptor wird außerdem nach Bindung verstärkt internalisiert und durch Endozytose abgebaut. Durch diese Verminderung der HER2-Menge auf der Zellmembran wirkt Trastuzumab der eigentlichen Überexpression entgegen. Das Zellwachstum und die Gefäßneubildung (Hemmung der Angiogenese durch Blockierung proangiogenetischer Faktoren und Induktion von Anti-Angiogenesefaktoren [85]) werden ebenfalls gehemmt. Die DNA-Reparaturmechanismen nach Chemotherapie oder Radiatio werden eingeschränkt und die Apoptose verstärkt induziert [86]. Auch die Abspaltung der ECD wird vermindert [87, 88].

Die erste Zulassung bei Wirksamkeitsnachweis bei fortgeschritten metastasiertem Mammakarzinom alleine und in Kombination mit Chemotherapie erlangte Trastuzumab in Deutschland im Jahr 2000 [89]. Dann folgte nach entsprechenden Studienergebnissen 2006 auch die Zulassung für die adjuvante Therapie [90, 91]. Eine Empfehlung für den *off label use* bei neoadjuvanem Einsatz wurde u.a. von der AGO Mamma 2011 bei signifikant größerer Ansprechrate bei Kombination von Paclitaxel mit Trastuzumab herausgegeben mit nun folgender Zulassung 2012 [92, 93].

Bei adjuvanem Einsatz im Frühstadium wurde eine 50 % Reduktion des Rezidivrisikos, als auch eine Verringerung des Risikos am Mammakarzinom zu sterben um ein Drittel beschrieben [84, 90, 91, 94]. Bei *first line* Einsatz bei metastasiertem Mammakarzinom ist eine alleinige Ansprechrate von 26 % [95] und in Kombination mit Chemotherapie von 63-79 % [96] beschrieben.

Zentrale Studien mit Trastuzumab zeigten eine Verbesserung des Ansprechens von 32 % auf 50 % bei Chemotherapie *versus* Chemotherapie mit Trastuzumab-Gabe (n=469, Patienten mit IHC 2+ und 3+ eingeschlossen) [97]. Damit wurde die Prognose der HER2 positiven Patienten drastisch verbessert. Dies hat zum Wandel in der Einschätzung der Aggressivität HER2 positiver Tumoren mit Separierung der „triple negativen“ Mammakarzinome geführt.

Wahrscheinlich tritt jedoch bei allen Tumoren irgendwann im Verlauf der Therapie eine Trastuzumabresistenz auf [95, 97]. Piccart-Gebhart et al. gehen davon aus, dass ca. 15 % aller HER2 positiven Mammakarzinome eine primäre Resistenz aufweisen [90].

Aufgrund der Überexpression von HER2 auf Myokardzellen ergibt sich die geringgradige Kardiotoxizität mit Folge einer im Allgemeinen reversiblen dilatativen Kardiomyopathie in 1-4,5 % der Fälle [98, 99]. An einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass HER2-HER4 Heterodimere nach akuten Stress-Signalen einen Myozyten-Überlebenspfad initialisieren [100]. Deshalb sind Patienten mit kardialen Einschränkungen vor einer möglichen Therapie zu identifizieren. Weitere mögliche Nebenwirkungen sind anaphylaktische Reaktionen, grippeartige Symptome, periphere Ödeme, Exantheme, Schlafstörungen, sowie gastrointestinale Symptome.

1.3.2 Lapatinib

Seit 2008 gibt es bei HER2 positivem Tumor in Deutschland ein zweites zugelassenes Medikament namens Lapatinib (Tyverb[®], GW572016, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NJ, USA). Es handelt sich dabei um ein sogenanntes „small molecule“, welches die intrazelluläre Tyrosinkinase von HER1(EGFR) und HER2 hemmen kann. Es bindet reversibel an der ATP-Bindungsstelle. Es hemmt die Aktivierung von Akt und MAPK. Die Zulassung erstreckt sich auf die Anwendung bei metastasierten Patienten nach dem Einsatz von Anthrazyklinen, Taxanen und Herceptin in einer Kombination mit Capecitabin.

Vorteil von Lapatinib gegenüber Trastuzumab ist die orale Einnahme, die Überwindung der Blut/Hirnschranke und die Wirksamkeit bei einem Verlust der extrazellulären Domäne. Auch die Tamoxifensensitivität kann mit Lapatinib verbessert werden [101]. Nachteilig ist, dass aufgrund der zusätzlichen Blockade von EGFR (HER1) auch zusätzliche Nebenwirkungen eine Rolle spielen könnten. Diarrhöe, Hauttoxizität, Fatigue und Leberwerterhöhung sind dabei vorrangig zu nennen. Die kardiale Toxizität scheint weniger ausgeprägt als unter Trastuzumab zu sein, wenngleich sie nicht definitiv ausgeschlossen werden kann. Doch der

Vergleich ist durch die meist primär gelaufene Trastuzumabtherapie aufgrund eines möglichen Selektionsfehlers erschwert [102].

1.3.3 Therapieresistenz

Ein aktuelles Forschungsthema ist die Resistenz gegenüber Anti-HER2 gerichteten Therapien. Dabei können Veränderungen des HER2-Rezeptors eine Rolle spielen. Zum Beispiel kann sich die ECD (p95) ablösen [88] oder ein membranassoziiertes Glykoprotein namens MUC4 kann sterisch die Anlagerung von Trastuzumab verhindern [103, 104]. Die Zellen können aber auch alternative Signalwege mittels Überexpression von IGF1R [105, 106] oder VEGF einschlagen. Auch mittels Signalweitergabe über HER1/HER3 oder HER1/HER1 Dimere oder infolge erhöhter Ligandenkonzentrationen kann der blockierte HER2- Signalweg umgangen werden. Ebenso können die beteiligten Effektoren des HER2-Signalweges in der Zelle, wie reduzierte Level von PTEN [107] oder p27kip1 [108] und erhöhte Level von Akt [109, 110] HER2 gerichtete Therapien einschränken [101]. Interessant ist dabei die Feststellung, das HER2 hoch amplifizierte Mammakarzinome (HER2/Chr.17 ratio 15-22) häufiger eine Resistenz auf Trastuzumab zeigen [111, 112].

1.3.4 Neue Therapieoptionen – Zukunft

Der Ausblick auf neue Therapieansätze ist vielversprechend. Es sind unter vielen Anderen Pertuzumab (Omnitarg[®], ein Antikörper gegen die Dimerisierungsdomäne von HER2), T-DM1 - ein Konjugat aus Trastuzumab und der zytotoxischen Substanz Emtansin, RAD001 (Everolimus[®], mTOR Inhibitor), neue Tyrosinkinaseinhibitoren (Neratinib und Pazopanib), sowie E75 - ein adjuvanter Impfstoff gegen HER2 in der Testung [87, 113-115]. Dabei sind die Kombinationen aus zielgerichteten Substanzen miteinander, als auch mit anhaftenden zytotoxischen Chemotherapeutika sehr interessante Ansätze.

1.4 Zielstellung

- 1.1 Welche Validität (Spezifität/Sensitivität) besitzt die HER2-Bestimmung mittels HercepTest™, CISH und FISH am stanzbiptischen Material bei Patientinnen mit resektatgesichertem Mammakarzinom?
- 1.2 Wie groß sind dabei die prädiktiven Vorhersagewerte des HER2-Status des stanzbiptischen Materials bei Patienten mit resektatgesichertem Mammakarzinom?
- 1.3 Wie sind die Ergebnisse der einzelnen Methoden zur HER2-Bestimmung von Stanze und Resektat miteinander assoziiert (*Konkordanz* (beobachtete Übereinstimmung), sowie zufallskorrigierte Übereinstimmung)?

2. Wie sind die HER2-Status Ergebnisse der drei Methoden HercepTest™, CISH und FISH innerhalb des Stanz- und OP-Kollektives miteinander assoziiert (je zwei miteinander: *Konkordanz* (beobachtete Übereinstimmung), sowie zufallskorrigierte Übereinstimmung)?

- 3.1 Welche Validität besitzt die Hormonrezeptorbestimmung (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) anhand von stanzbiptischem Material bei Patienten mit resektatgesichertem Mammakarzinom?
- 3.2 Wie groß sind die prädiktiven Vorhersagewerte des Hormonrezeptor-Status des stanzbiptischen Materials bei Patienten mit resektatgesichertem Mammakarzinom?
- 3.3 Wie sind die Ergebnisse des Hormonrezeptor-Status von Stanze und Resektat miteinander assoziiert (*Konkordanz* (beobachtete Übereinstimmung), sowie zufallskorrigierte Übereinstimmung)?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tumorkollektiv

Es wurden ausschließlich Patienten in die Studie aufgenommen, die im Zeitraum von Anfang 2003 bis 2008 in der Universitätsklinik für Gynäkologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) aufgrund eines Mammakarzinoms operiert wurden. Die Stanzbiopsien der Mammakarzinome wurden dabei entweder in der dortigen Ambulanz oder in der Universitätsklinik für Radiologie entnommen.

Für die sonographisch gestützte Stanzbiopsie wurde in unserer Ambulanz das Achieve® Automatic Biopsy System CA 1411, ein koaxiales programmierbares automatisches Biopsie-System, 14 G x 11cm. (Cardinal Health, Vaughan, Kanada) verwendet. Damit erfolgte die Entnahme von 5-6 Zylindern. Bei sonographisch gestützten Stanzen in der Mammographie-Abteilung (Universitätsklinik für Radiologie) wurde entweder auf das gleiche System oder auf eine sonographisch gestützte Vakuumbiopsie: Biopsy Probe Vacora Biopsiesystem 10118 (10 G x 118 mm) (Bard Biopsy Systems, Tempe, AZ, USA), (ebenfalls 5-6 Zylinder) zurückgegriffen. Mammographisch und MRT gestützte Stanzbiopsien erfolgten mit dem Vakuumstanzsystem Mammotome® MST11B (11Gauge) (Biopsys, Irvine, CA, USA) bei Entnahme von 10-20 Stanzzyindern.

Die Stanz- und Resektatgewebe wurden unmittelbar nach Entnahme (spätestens 15 Minuten danach, aufgrund der Präparateradiographie) in 4 %-iger neutral gepufferter Formalinlösung für mindestens 2 (Stanzen), bzw. 6 (Resektate) bis maximal 48 Stunden fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Im Durchschnitt lagen drei bis sechs Stanzzyylinder in Paraffin vor. Abhängig war die Anzahl dabei von der Stanzbiopsiemethode als auch von der makroskopischen Einbettung durch das Institut für Pathologie. Außerdem wurden zumeist drei Stanzzyylinder an das Forschungslabor der Universitätsklinik für Gynäkologie (Leitung Herr Prof. Dittmer) abgegeben.

Alle Proben wurden retrospektiv aus dem Institut für Pathologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) rekrutiert, wo sie zuvor bereits histopathologisch ausführlich im elektronischen Befundsystem (PAS, Computersystem Paschmann) beschrieben worden waren. Bei diesem Kollektiv wurde auf die Rekrutierung von neoadjuvant therapierten Patienten, sowie von Paaren mit wenig Resttumor im Block verzichtet. Es handelt sich in allen Fällen um Mammagewebe mit Karzinomanteilen. Dabei wurden Blöcke ausgewählt, bei denen bereits für die

histopathologische Diagnostik der HercepTest™ routinemäßig durchgeführt wurde. Bei den 90 Fällen, wo kein HercepTest™-Ergebnis vorlag, wurde die Auswahl nach lichtmikroskopischer Beurteilung der Präparate und in Bezug auf Lokalisation der Stanzhöhle im Tumor getroffen und die Immunhistochemie mit dem HercepTest™ Kit der Firma DAKO nachgefertigt. Im Anschluss wurden die Proben mittels CISH im Labor des Institutes für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg analysiert. Danach führte ich eine primäre Beurteilung der Proben durch. Anschließend fand eine verblindete Bewertung durch einen erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. med. H.-J. Holzhausen) des Institutes für Pathologie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) statt. Nach der Auswertung wurden alle Blöcke in das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden geschickt, wo die FISH-Testung einschließlich ihrer Auswertung ebenfalls verblindet durchgeführt wurde.

2.2 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurden alle Testergebnisse ausgewertet. Insgesamt konnten wir von 222 Patientinnen ausgehen, von denen wir jeweils ein HercepTest™-Ergebnis der Stanze und des zugehörigen OP-Resektates vorweisen konnten. Davon konnten wir bei 211 Patienten eine CISH bei beiden Präparatetypen erfolgreich durchführen. In 185 Fällen konnten wir ein komplettes FISH-Ergebnis hinzufügen.

Tabelle 2-1 Zusammensetzung des Kollektives

	<i>Stanzen</i>	<i>Resektate</i>	<i>Paare</i>
ges.	222	222	222
IHC ER	222	204	204
IHC PgR	222	202	202
HercepTest™	222	222	222
CISH	218	216	211
FISH	202	193	185

IHC ER Immunhistochemie Östrogenrezeptor, IHC PgR Immunhistochemie Progesteronrezeptor

Es wurden 208 Stanz-/OP-Gewebepaare zur FISH-Durchführung versandt. Drei Fälle fehlten bei Versendung der Blöcke.

Bei der Vorbereitung zur Hybridisierung war in 10 Resektatfällen und drei Stanzfällen kein Tumor oder zu wenig Resttumor nachweisbar. In sechs weiteren Fällen war die Hybridisierung trotz mehrfachen Versuches erfolglos geblieben.

Davon waren zwei Stanzfälle. Jeweils zwei Stanzblöcke und Resektatblöcke wurden aufgrund ihres Fehlens im Kollektiv nicht hybridisiert.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 2-2 bis 2-5) geben einen Überblick über die Verteilung des pT-Status, des pN-Status, den Differenzierungsgrad, sowie des histologischen Subtyps im Kollektiv.

Tabelle 2-2 Verteilung des pT-Status des Kollektives nach [116].

<i>pT-Status</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Prozent</i>
pT1a	6	2,7
pT1b	35	15,8
pT1c	92	41,4
pT2	78	35,1
pT3	5	2,3
keine Angabe	6	2,7

pT entsprechend [116]

Anzumerken ist, dass im Kollektiv keine pT4 Fälle eingeschlossen sind, da hier klinisch zumeist ein neoadjuvanter oder palliativer Therapieansatz beschlossen wurde. Damit wäre bei diesen Fällen keine adäquate Auswertung im Rahmen Vergleich der Stanze und des Resektates möglich gewesen.

Tabelle 2-3 Verteilung des pN-Status im Kollektiv nach Singletary et al. 2002[117]

<i>pN-Status</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Prozent</i>
pN0	151	68,0
pN1	39	17,6
pN2	11	5,0
pN3	7	3,1
keine Angabe	14	6,3

Tabelle 2-4 Verteilung des Grading innerhalb der Resektate nach Elston & Ellis [118];
G = Grading

<i>Grading</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Prozent</i>
G1	45	20,3
G2	131	59,0
G3	38	17,1
keine Angabe	8	3,6

Tabelle 2-5 Verteilung des histologischen Subtypes innerhalb der Resektate

Histologie	Anzahl	Prozent
duktal	175	79,2
lobulär	24	10,9
duktulolobulär	8	3,6
basalzellartig	2	0,9
medullär	2	0,9
tubulär	5	2,3
muzinös	3	1,4
siegelringartig	1	0,5
papillär	1	0,5
keine Angabe	1	0,5

2.3 Labormaterialien

2.3.1 Chemikalien, Antikörper und Kits

Tabelle 2-6 Chemikalien, Antikörper und Kits

AEC-Chromogen-Substratlösung	Zytomed Systems, Berlin
BT-Puffer: 6,2 g Natriumhydrogencarbonat 0,1 g tri-Natriumcitrat x 2H ₂ O in 500 ml destilliertem Wasser	Merck, Darmstadt
CISH – Zyto Dot SPEC HER2 Probe Kit	Zytomed Systems, Berlin
Ethanol 96 %	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
FISH – PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA
Hämalaun nach Mayer: 1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat	Merck, Darmstadt

50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure auf 1000 ml destilliertes Wasser	
HercepTest™(DAKO) Kit	DAKO, Glostrup, Dänemark
Immunhistochemie-Kit	Zytomed Systems, Berlin
Natriumcitratpuffer pH 6,0: 9ml 0,1 M Zitronensäure 41 ml 0,1 M Natriumcitrat auf 500 ml destilliertes Wasser (pH einstellen)	Merck, Darmstadt
Natriumthiocyanatlösung 1M in destilliertem Wasser	Merck, Darmstadt
Östrogen Rezeptor Antikörper (Clone SP1)	Lab Vision Corporation, Fremont, Kalifornien, USA
PBS (phosphate buffered saline) 0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4, at 25 °C.	Sigma, Deisenhofen
Pepsinlösung: 1g Pepsin vorsichtig in 10ml destilliertem Wasser gelöst	Merck, Darmstadt
Pepsin-HCL-Lösung: 85 µl Pepsinlösung mit 915 µl HCL (pH 2,0) mischen	Merck, Darmstadt
Progesteron Rezeptor Antikörper (Clone SP2)	Lab Vision Corporation, Fremont, Kalifornien, USA
SSC Puffer (20-fach) einfach: 0.150 M Natriumchlorid, 0.015 M Natriumcitrat	Merck, Darmstadt

TBS Puffer 8,8 g NaCl (Endkonzentration 150 mM), 2,42 g Tris-HCl (20 mM) in 1000 ml H ₂ O	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

2.3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abzug	Trox Technik, Neukirchen-Vluyn
Dampfgarer Multi Gourmet Braun®	Braun GmbH, Kronberg/Taunus
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Fixo Gum (Rubber Cement)	Zytomed-Systems, Berlin
ISH-Hybridizer "Thermo Brite"	Zytomed Systems, Berlin
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop BX40 F4	Olympus, Hamburg
Mikroskop Axioplan 2, Objective Plan-apochromat $\times 100=1:40$, Filter Double band pass filter set 23	Zeiss (Oberkochen)
Objektträger Super Frost Plus®	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Shandon Coverplates™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

2.4 Immunhistochemie Östrogenrezeptor SP1 und Progesteronrezeptor SP2 (Lab Vision Corporation)

2.4.1 Grundlagen

Das immunhistochemische Verfahren erfolgte mit der indirekten Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Nach der Bindung des monoklonalen Antikörpers (Kaninchen anti-Mensch gegen ER bzw. PgR gerichteter Antikörper) an das entsprechende Epitop erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers. Die danach verabreichte Peroxidase konjugiert mit Streptavidin-Molekülen reagiert mit dem gebundenen Biotin. Durch die Zugabe des AEC Chromogen, welches durch die Peroxidase lokal zur Anfärbung führt, erfolgt die Visualisierung des Epitopes.

2.4.2 Durchführung und Auswertung

Die Durchführung erfolgte manuell mit konventionellen Shandon Coverplates™, den Primärantikörpern der Firma Lab Vision Corporation und dem Immunhistochemie Kit der Firma Zytomed®. Nach der Herstellung 2-4 µm dicker Schnitte wurden die Präparate auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei 58°C für mindestens 2 Stunden getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung im Xylol-Bad für zweimal 10 Minuten und die anschließende Hydratation in absteigender Ethanolreihe bis 100 % destilliertes Wasser. Anschließend wurde mit PBS für 2x3 Minuten gespült. Zur Demaskierung der Antigene (epitope retrieval) wurden die Schnitte in Natriumcitratpuffer pH 6,0 (10mM Natriumcitratpuffer: 14,7g Tri-Natriumcitrat auf 500ml destilliertes Wasser mit -21ml 1N HCL auf pH 6 eingestellt) für 40 Minuten bei 95°C im Dampfgerar erhitzt. Für weitere 20 Minuten verblieben sie zum Abkühlen bei Raumtemperatur.

Es wurde mit destilliertem Wasser gespült und für 10 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert. Danach wurden die Objektträger in die Shandon Coverplates™ eingelegt und erneut mit destilliertem Wasser, sowie für 3x1 Minute mit PBS gespült. Nachdem der Primärantikörper entsprechend der Versuchsvorschrift der Firma Lab Vision Corporation auf 1:400 verdünnt wurde, erfolgte die Inkubation der Schnitte für 30 Minuten. Anschließend wurden vier Tropfen des biotinylierten Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörpers für 10 Minuten Dauer aufgetropft. Es folgten vier Tropfen des Streptavidin konjugiert mit der Meerrettichperoxidase für weitere 10 Minuten. Nach erneutem Waschen mit PBS für 3x3 Minuten wurden die Objektträger aus den Coverplates ausgespannt. In horizontaler Lage erfolgte die Inkubation mit frisch zubereitetem AEC-Chromogen-Substrat (Aminoethylcarbazol) für 10 Minuten. Nach

einem Spülgang in der Küvette mit Leitungswasser wurde für 5 Minuten mit Hämalun nach Mayer gegengefärbt. Abschließend wurde erneut mit Leitungswasser gespült.

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop nach folgenden Kriterien (Tabelle 2-8): Die Färbintensität (SI) der Anfärbung und der Prozentsatz positiver Zellkerne werden gegeneinander aufgetragen. Die zugewiesenen Punkte werden jeweils miteinander multipliziert und ergeben den IRS. Alle Präparate mit einem IRS-Ergebnis > 2 zeigen dabei einen positiven Befund.

Tabelle 2-8 Immunreaktiver Score Hormonrezeptoren nach Remmele, W. & Stegner, H. (1987) [119].

Prozentsatz positiver Zellkerne	Färbeintensität			
	Keine Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	Starke Farbreaktion = 3 Punkte
keine positiven Zellkerne = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<10 % positive Zellkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50 % positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80 % positive Zellkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
>80 % positive Zellkerne = 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Immunreaktiver Score (IRS): SI(*stain intensity*) x PP (Prozentsatz positiver Zellkerne)

2.5 Immunhistochemie - HercepTest™(DAKO)

2.5.1 Grundlagen

Der HercepTest™ ist ein immunhistochemisches Verfahren bei dem ein polyklonaler Antikörper gegen das C-terminale Ende des HER2-Proteins zu einem Mammakarzinompräparat hinzugegeben wird. Nach Bindung des primären Antikörpers (polyklonal, Kaninchen anti-HER2) erfolgt die Zugabe eines zweiten Peroxidase markierten Antikörpers (*visualization reagent*, Lösung beinhaltet: sekundären polyklonalen Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen) und Meerrettich-Peroxidase mit einem Gerüst aus Dextran Polymer). Es wird DAB als Chromogen hinzugefügt. Die gebundene Peroxidase bewirkt die Oxidation von DAB, welches dadurch polymerisiert und zu einem sichtbaren bräunlichem Produkt umgesetzt wird.

2.5.2 Durchführung und Auswertung

Die Methode wurde nach folgendem Protokoll mit dem Kit der Firma DAKO durchgeführt:

Es wurden Schnitte von einer Präparatdicke von 4 µm hergestellt und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei 58°C für zwei Stunden getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung im Xylol-Bad für 2x10 Minuten und die anschließende Hydratation in absteigender Ethanolreihe bis 100 % destilliertes Wasser. Danach wurden die Schnitte bei 96°C für 40 Minuten in Epitope Retrieval Solution (verdünnt auf 1:10) im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen in TBS für 20 Minuten wurden die Präparate nochmals mit TBS gespült. Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte durch Inkubation mit Peroxidase-Blocking-Reagenz für fünf Minuten. Jetzt inkubierte man nach Zugabe von 100 µl Rabbit Anti-Human-HER2-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur und spülte im Anschluss mit TBS für fünf Minuten.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (Visualisations Reagenz) und 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Es wurde abermals mit TBS für 5 Minuten gespült. Es folgt die Zugabe von 10 µl Chromogen-Lösung mit DAB für 10 Minuten. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurde mit saurem Hämalaun gefärbt und durch Spülen mit Leitungswasser die Färbung gebläut.

Nach Dehydrierung in ansteigender Ethanolreihe (70, 96 und 100 %) und anschließender Inkubation in Xylol für 2x2 Minuten wurden die Präparate mit *Mounting Solution* eingedeckt. Dabei wurden zur Qualitätskontrolle jeweils eine positive und negative hausinterne Kontrolle, sowie der mitgelieferte Kontrollobjektträger mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop nach folgenden Bewertungskriterien:

Tabelle 2-9 Bewertungskriterien nach DAKO zur Bestimmung des HER2-Status mit dem HercepTest™ (nach HercepTest™ Gebrauchsanweisung (Code K5204 [120])).

Färbung Zellmembran	Score	HER-2 Überexpression
Keine oder < 10 % der Tumorzellen	0	Negativ
Schwache oder unvollständige in > 10 % der Tumorzellen	1+	Negativ
Schwache bis mäßig komplette in > 10 % der Tumorzellen	2+	schwach positive
Starke komplette in > 10 % der Tumorzellen	3+	stark positive

Je nach Prozentsatz der angefärbten Zellen werden die Fälle den vier Kategorien zugeordnet. Präparate mit einem 3+ Ergebnis sind als positiv werten. Alle Präparate mit einem indifferenten Score von 2+ müssen zusätzlich entweder mittels FISH oder CISH hinsichtlich der Genamplifikation untersucht werden.

Charakteristische Darstellungen der immunhistochemischen Anfärbung der Mammakarzinomzellen für den HercepTest™ im vorliegenden Kollektiv sind exemplarisch in Abbildung 2-1 zu sehen.

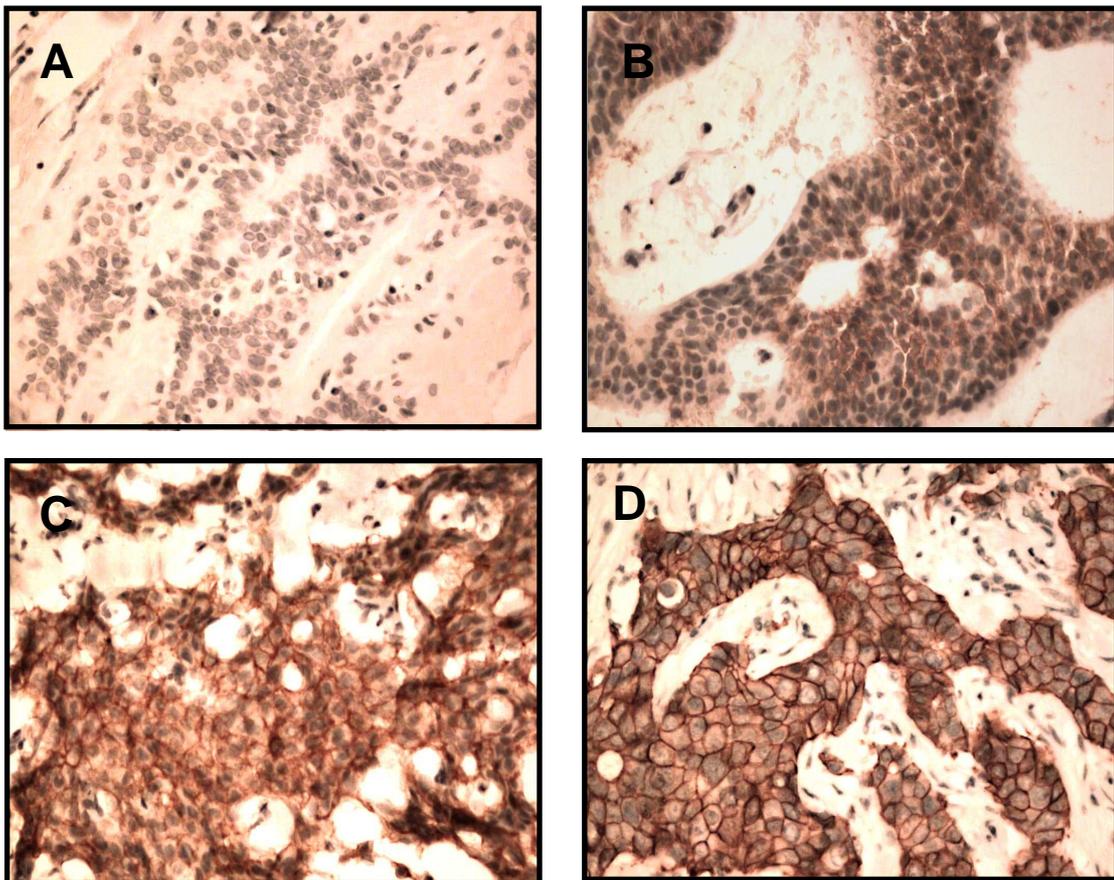


Abbildung 2-1 Charakteristische Darstellung der immunhistochemischen Anfärbung der Mammakarzinomzellen A HercepTest™ Score 0, B HercepTest™ Score 1+, C HercepTest™ Score 2+, D HercepTest™ Score 3+.

2.6 CISH - Chromogen *In Situ* Hybridisierung - Zyto Dot SPEC HER2 Probe Kit (ZYTOMED-SYSTEMS)

2.6.1 Grundlagen

Die CISH vereint molekularbiologische Technik mit dem immunhistochemischen Nachweis. Nach entsprechender Denaturierung liegt die Doppelstrang-DNA in 2 Einzelsträngen vor. Mittels Digoxigenin-markierten Nukleinsäuren, die an ihren komplementären Basenstrang in der DNA binden, kann das entsprechende Gen,

hier HER2 (17q12), hybridisiert und somit detektiert werden. Anschließend wird ein anti-DIG Antikörper (monoklonal, Maus) zugegeben. Es folgt eine Inkubation mit einem Anti-Maus-HRP-Aminosäuren-Polymer (monoklonal, Ziege). Durch Hinzugabe der Chromogen-Lösung (DAB) wird der durch die Peroxidase markierte Bereich sichtbar gemacht.

2.6.2 Durchführung und Auswertung

Diese Methode wurde nach folgendem leicht abgewandeltem Protokoll der Firma ZYTOMED-SYSTEMS durchgeführt:

Denaturierung und in situ Hybridisierung (1. Tag)

Es wurden von jedem Gewebeblock Mikrotomschnitte von 5 µm Schnittdicke angefertigt. Diese wurden auf Superfrost- Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei 37°C getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung. Dafür wurden die Schnitte bei 67°C für 15 Minuten inkubiert. Dann wurden sie für 2x15 Minuten in Xylol, danach 3x3 Minuten in 100 % Ethanol inkubiert und 3x2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Die Präparate wurden in erwärmter Heat Pretreatment Solution EDTA bei 95°C im Dampfgerar für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden sie für 3x2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurde das Gewebe bedeckend 8°C gekühltes Pepsin auf die luftgetrockneten Objektträger gegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden soweit nicht anders angegeben in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Es erfolgte abermals ein Waschgang mit destilliertem Wasser für 3x2 Minuten.

Mittels ansteigender Ethanolreihe (70, 96 und 100 %) wurden die Schnitte dehydriert. Danach wurde tropfenweise HER2-Sonde auf die Deckgläser gegeben und die Schnitte damit eingedeckt. Der Deckglasrand wurde mit Fixogum Kautschuk Kleber versiegelt.

Es folgte die Denaturierung für 10 Minuten bei 98°C und die anschließende Hybridisierung für ca. 23 Stunden bei 37°C.

Chromogene Markierung (2. Tag)

Am folgenden Tag wurde nach abgeschlossener Hybridisierung der Kleber manuell und die Deckgläser beim Waschen mit Wash Buffer SSC für 5 Minuten entfernt. Dann wurden die Objektträger im Wash Buffer SSC für 5 Minuten bei 75-80°C in der Mikrowelle erhitzt.

Es folgte ein Waschgang in destilliertem Wasser, sowie die Inkubation in 3 % H₂O₂ für 10 Minuten. Anschließend wurde für 3x2 Minuten in PBS/Tween gewaschen.

Auf die Schnitte wurden zwei Tropfen Blocking Solution aufgetropft und für 10 Minuten inkubiert. Nach vorsichtigem Abtupfen der Solution wurden zwei Tropfen MouseAnti-DIG auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Dann erfolgte wieder ein Waschgang in PBS/Tween. Es wurden zwei Tropfen Anti-Mouse-HRP-Polymer aufgetropft und für 30 Minuten inkubiert.

Nach dem letzten Waschgang mit PBS/Tween wurde die Farbstofflösung, die direkt aus 1 ml DAB Solution B und einem Tropfen DAB Solution A hergestellt wurde, auf die Schnitte großzügig bedeckend gegeben und letztmalig für 30 Minuten inkubiert.

Die Schnitte wurden in eine Küvette überführt und bei laufendem Leitungswasser für 2 Minuten gewaschen. Diese Waschprozedur wurde nach 5 Minuten Gegenfärbung in Hämalun nach Mayer wiederholt.

Nach Dehydrierung in ansteigender Ethanolreihe (70, 96 und 100 %) und anschließender Inkubation in Xylol für 2x 2 Minuten wurden die Präparate mit Mounting Solution eingedeckt.

Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Untersuchungsgegenstände erfolgte zuerst in der Übersicht bei 10-facher und im Anschluss zur Detailbeurteilung bei 40-facher Vergrößerung. Es wurden nach Gesamtbeurteilung des Präparates in einem repräsentativen Bereich mindestens 30 Zellen im Detail beurteilt. Die Signale kamen als braune Punkte zur Darstellung. Signalhaufen (Cluster) oder ≥ 6 Signale (Genkopien) pro Zelle in mehr als 50 % der Zellen entsprachen einer Überamplifikation. Wir legten infolge der überwiegenden Berichte und nach Empfehlung des Beipackzettels diese Grenze von ≥ 6 Kernsignalen in der CISH für eine eindeutige Amplifikation des HER2-Gens fest [121-125]. Bei grenzwertigen Befunden von 4-6 Signalen pro Zelle erfolgte in der Regel eine erneute Beurteilung des Befundes mit Auszählung weiterer Zellen. Die Zuordnung konnte daraufhin zweifelsfrei erfolgen.

In Abbildung 2-2 haben wir exemplarisch 2 Fälle der Anfärbung im Rahmen der CISH-Diagnostik unseres Kollektives dargestellt.

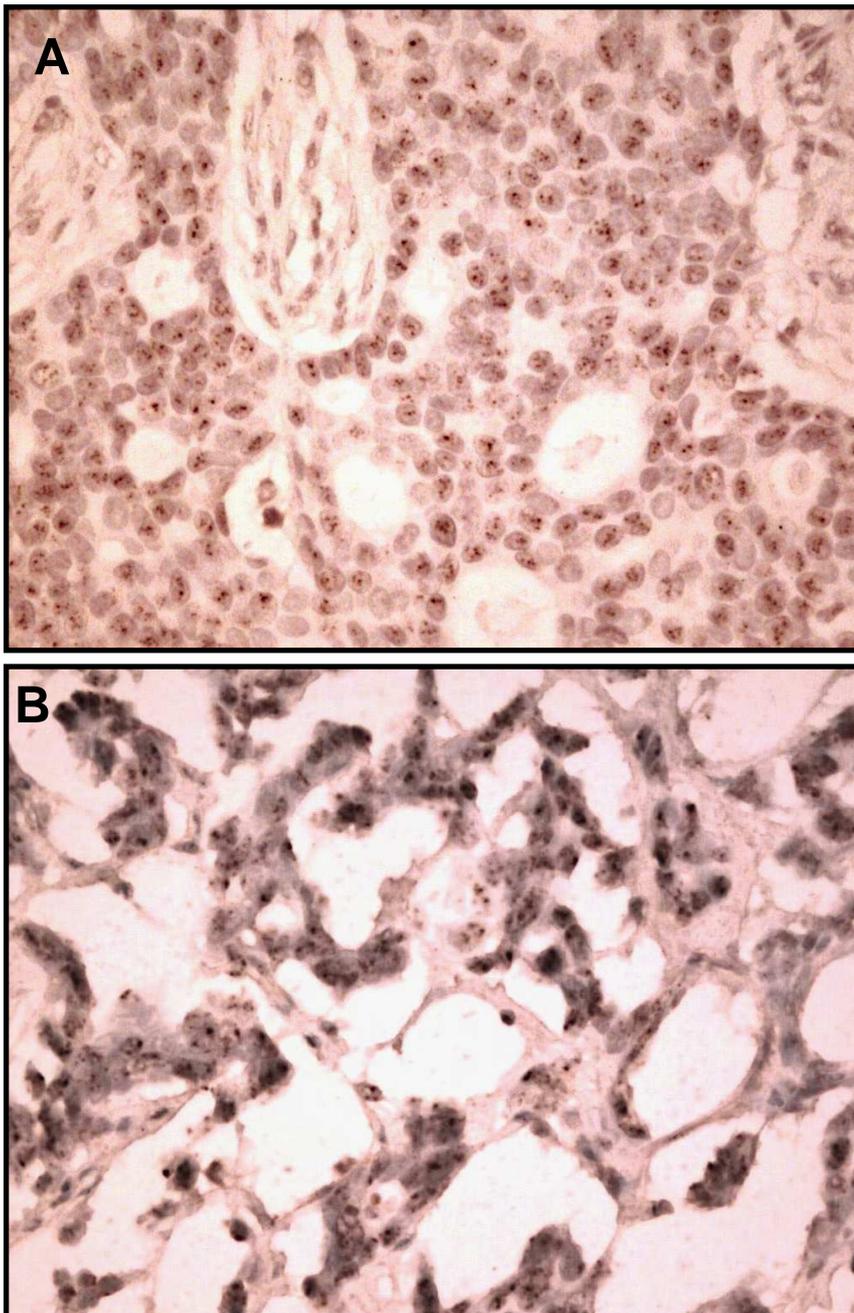


Abbildung 2-1 Charakteristische Darstellung der Anfärbung der HER2-Signale im Zellkern mittels CISH, **A** Mammakarzinomzellen mit im Durchschnitt 2 Signalen = HER2 nicht amplifiziert, **B** Mammakarzinomzellen mit > 5 HER2- Signalen = HER2 amplifiziert, z.T. Clusterbildung.

2.7 FISH - Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung – HER-2 DNA Probe Kit (PathVysion Kit, Abbott)

2.7.1 Grundlagen

Es handelt sich hierbei um eine mit der CISH vergleichbare molekularbiologische Technik. Grundlage ist ebenfalls die Anlagerung einer zum DNA Abschnitt komplementären Sonde für HER2 (detektiert 17p11.2-q12 SpectrumOrange). Zur Darstellung wird aber eine Fluoreszenzmarkierung der Sonde angewendet. Außerdem ist es möglich durch Einsatz einer zweiten Sonde bei unterschiedlicher Farbfluoreszenz ebenfalls die Zentromer-Region des Chromosoms 17 (CEP17: detektiert 17p11.1-q11.1 SpectrumGreen) zu markieren und dabei eine Aneuploidie der Zelle auszuschließen.

Die Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus, Dresden, da dieses Institut diese Untersuchung als eines von wenigen Zentren deutschlandweit routinemäßig durchführt. Außerdem konnten wir bei entsprechender Verblindung die Daten als zusätzliche externe Qualitätskontrolle nutzen.

2.7.2 Durchführung und Auswertung

Die Hybridisierung wurde mit dem Kit der Firma Abbott nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung, In-situ-Hybridisierung (1.Tag)

Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von max. 4 µm wurden auf Objektträger gezogen und bei 60°C mindestens zwei Stunden oder über Nacht im Wärmeschrank getrocknet. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert. Sie wurden für 30 Minuten in Xylol bei 45°C und danach in absteigender Alkoholreihe (für 10 Minuten in 100 % Ethanol, für 3 Minuten in 90 % Ethanol und für abermals 3 Minuten in 70 % Ethanol) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet. Nun erfolgte die Zugabe von je 200 µl vorgewärmter (80°C) 1M Natriumthiocyanatlösung auf jeden Objektträger. Es wurde mit einem Deckglas 24x60 mm versiegelt und für 58 Minuten in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 80°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte für 3 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und dabei das Deckglas entfernt. Es folgte die Zugabe von je 200 µl einer Pepsin-HCl-Lösung und nach Versiegelung mit einem Deckglas 24x60 mm eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C für 58

Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte in destilliertem Wasser für 3 Minuten gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 80°C im Wärmeschrank vorbereitet. Nach Zugabe von je 14 µl Sonde und einem Deckglas von 15x15 mm wurden die Schnitte für 10 Minuten bei 80°C weiter denaturiert. Anschließend wurden sie mit Fixogum Kautschuk Kleber versiegelt und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer gelagert.

Fluoreszenz-Markierung (2.Tag)

Am Folgetag wurde ausschließlich in Dunkelheit gearbeitet. Die Schnitte wurden dreimal für 10 Minuten in SSC-Puffer (1:10 verdünnt) bei 42°C gewaschen. Danach folgte ein Waschschrift für 1 Minute in 50 ml BT-Puffer + 50 µl Tween20 bei 42°C. Die Schnitte wurden luftgetrocknet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von ca. 40 µl DAPI-Counterstain und Eindeckelung mit einem Deckglas von 20x20 mm. Die Ränder wurden mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden in Histologiemappen im Kühlschrank bis zur Auswertung aufbewahrt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Die Histomorphologie wurde anhand eines HE-Schnittes nachempfunden, um wirklich nur invasive Tumorzellen bei der Auswertung einzubeziehen. Die Zellkerne stellten sich aufgrund der DAPI-Färbung leuchtend blau dar. Das HER2-Signal kam orange-rot und das Signal für das Zentromer von Chromosom 17 grün zur Darstellung. Nach Auszählung von 20 Interphase Zellkernen wurden die durchschnittliche Signalanzahl von HER2 und Chromosom 17 miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Fälle wurden ab einer HER2/CEP17-Ratio von ≥ 20 als amplifiziert bewertet. Bei grenzwertigen Fällen mit einer Ratio von 1.8-2.2 erfolgte die Nachbeurteilung durch Auszählung weiterer 20 Fälle.

2.8 Auswertung und Statistik

Die Auflistung aller Daten erfolgte mittels Microsoft Excel[®]. Anschließend wurden sie mit Unterstützung durch Herrn Prof. A. Stang, Institut für Klinische Epidemiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit SAS/STAT[®] Software statistisch ausgewertet. Mittels der Konkordanz (*observed agreement*) beschrieben wir die beobachtete Übereinstimmung der betrachteten Ergebnisse. Als statistisches Maß zur Bewertung der zufallskorrigierten Übereinstimmung (*Interrater-Reliabilität*) verwendeten wir *Cohens Kappa* (κ). Dies kann zur Einschätzung der Übereinstimmung von zwei verschiedenen Tests für die Bestimmung von HER2 in Abhängigkeit von der

zufällig erwarteten Übereinstimmung der Ergebnisse angewandt werden. Bei mehr als zwei Testergebnissen, die kategorial zu ordnen sind, kann man Fleiss' Kappa (*weighted kappa*) benutzen, welches bei der Berechnung die Ordnung der Werte einbezieht.

Es gibt verschiedene Einstufungen der Ergebnisse des κ -Wertes. Greve und Wentura beschrieben κ -Werte von 0,40 bis 0,60 als annehmbar, Werte unter 0,40 sollten jedoch mit Skepsis betrachtet werden. Interrater-Reliabilitätswerte von $\kappa \geq 0,75$ erscheinen gut bis ausgezeichnet [126].

Landis und Koch [127] schlagen dagegen folgende Einteilung vor:

- $\kappa < 0$ = -schlechte Übereinstimmung,
- $\kappa = 0-0,20$ -etwas Übereinstimmung,
- $\kappa = 0,21-0,40$ -ausreichende Übereinstimmung,
- $\kappa = 0,41-0,60$ -mittelmäßige Übereinstimmung,
- $\kappa = 0,61-0,80$ -beachtliche Übereinstimmung,
- $\kappa = 0,81-1,00$ -fast bis vollkommene Übereinstimmung.

Die Ergebnisse der Stanzbiopsie wurden dem Goldstandard, den Ergebnissen des Resektates gegenübergestellt mit Ermittlung der Werte für Sensitivität, Spezifität, sowie der positiven bzw. negativen prädiktiven Werte basierend auf der 4-Felder-Tafel.

3 ERGEBNISSE

3.1 Korrelation der Steroidrezeptor-Ergebnisse von Stanze und Resektat

Die Steroidrezeptoren werden von der Zelle im Zellkern exprimiert. Sie lassen sich demnach auch als kernständige Anfärbung mittels Immunhistochemie (Firma: Lab Vision Corporation, Antikörper: Östrogenrezeptor *clone* SP1, Progesteronrezeptor *clone* SP2) nachweisen. Die Auswertung erfolgte nach dem Remmele-Stegner Score und ergab die folgenden Ergebnisse (Tabelle 3-1) hinsichtlich der Korrelation des Östrogenrezeptor-Status von Stanze und Resektat [119].

Tabelle 3-1 Korrelation des Östrogenrezeptor(ER)-Status von Stanze und Resektat

ER	Resektat		
Stanze	neg (IRS 0-2)	pos (IRS>2)	Total
neg (IRS 0-2)	32	2	34
pos (IRS>2)	11	159	170
Total	43	161	204

IRS=Immunreaktiver Score

Dabei konnte in 83,3 % der Stanzfälle und in 78,9 % der Resektate ein positiver Östrogenrezeptorstatus aufgezeigt werden (Tabelle 3-1). Die Korrelation des ER-Status war mit einem kappa von 0,79 nahezu perfekt bei einer Konkordanz von 94 % (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Übereinstimmung des Östrogenrezeptor(ER)-Status von Stanze und OP-Resektat

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,94 (n=191)	0,89-0,96
κ	0,79	0,69-0,90

Betrachtet man im Detail die Fälle mit diskrepantem ER Ergebnis im Vergleich Stanze *versus* Resektat der Patienten (siehe Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4) so wurden mehr Fälle in der Stanze als ER positiv diagnostiziert, welche dann im Resektat ein negatives ER Expressionsmuster zeigten. Die zwei Fälle mit negativem ER Stanzergebnis und positivem ER Resektatergebnis standen durchweg positiven Hormonrezeptor-Ergebnissen gegenüber (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Darstellung der Fälle Stanze ER negativ/OP ER positiv mit PgR (n=2)

<i>ER-IRS</i>		<i>PgR-IRS</i>	
<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>
0	12	12	12
2	12	3	12

ER=Östrogenrezeptor, PgR=Progesteronrezeptor, IRS=Immunreaktiver Score

Demgegenüber standen 11 Fälle mit positivem ER und negativem PgR, von denen drei Fälle auch in den Restbefunden nach IRS keine positive Anfärbung zeigten und somit möglicherweise in der Stanze falsch positiv sein könnten. Nach aktueller Forderung bereits 1 % Anfärbung der Zellen als Hormonrezeptorpositivität zu definieren, blieb lediglich ein eventuell falsch positiver Fall übrig.

Tabelle 3-4 Darstellung der Fälle Stanze ER positiv/OP ER negativ mit PgR (n=11)

<i>ER-IRS</i>		<i>PgR-IRS</i>	
<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>
3	0	6	0
9	0	0	12
8	0	0	9
6	0	9	6
6	0	12	9
9	2	4	9
12	0	9	3
12	2	12	6
4	0	1	0
6	2	0	0
12	0	0	0

ER=Östrogenrezeptor, PgR=Progesteronrezeptor, IRS=Immunreaktiver Score

3.1.1 Korrelation des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und OP-Resektat

Bei der Korrelation des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und OP-Resektat war dieser in 64,8 % der Stanz- und den Resektatfällen positiv nachweisbar (siehe Tabelle 3-5). Eine Übereinstimmung zwischen Stanze und Resektat konnte allerdings nur in 86 % der Fälle gezeigt werden (siehe Tabelle 3-6). Darauf bezogen ergab sich ein *kappa* von 0,7.

Tabelle 3-5 Korrelation des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und Resektat

PgR	Resektat		
Stanze	neg (IRS 0-2)	pos (IRS>2)	Total
neg (IRS 0-2)	57	14	71
pos (IRS>2)	14	117	131
Total	71	131	202

IRS=Immunreaktiver Score

Tabelle 3-6 Übereinstimmung des Progesteronrezeptor(PgR)-Status von Stanze und OP-Resektat

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,86 (n=174)	0,8-0,9
κ	0,70	0,59-0,8

Betrachtet man die diskordanten ER negativen/PgR positiven Fälle (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8), so findet man mehr möglicherweise falsch negative Befunde auf Seiten der Resektate.

Tabelle 3-7 Darstellung der Stanzbiopsie- Fälle ER negativ/PgR positiv (n=3)

ER-IRS		PgR-IRS	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
0	12	12	12
2	12	3	12
0	0	4	4

ER=Östrogenrezeptor, PgR=Progesteronrezeptor, IRS=Immunreaktiver Score

Tabelle 3-8 Darstellung der Resektatfälle-Fälle ER negativ/PgR positiv (n=8)

<i>ER-IRS</i>		<i>PgR-IRS</i>	
<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>
0	0	4	4
8	0	0	9
6	0	9	6
9	0	0	12
6	0	12	9
12	0	9	3
9	2	4	9
12	2	12	6

ER=Östrogenrezeptor, PgR=Progesteronrezeptor, IRS=Immunreaktiver Score

Bei Darstellung der höchstwahrscheinlich unrealistischen Fälle mit einem negativen ER bei positivem PgR fiel auf, dass das negative Ergebnis im Rahmen der ER Bestimmung sicher eher auf einer fehlerhaften IHC basierte.

3.2 Korrelation der HER2-Ergebnisse von Stanze und Resektat

3.2.1 Korrelation des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™

Wir nahmen die Gegenüberstellung der Daten primär für die einzelnen IHC score Werte vor (Tabelle 3-9) und fassten diese dann durch Einschluss in die übergeordneten Gruppen weiter zusammen (Tabelle 3-11 und 3-15). Drei von 21 als positiv bewerteten Stanzbefunden waren im Resektat negativ, entsprechend einer Falsch-Positiv-Rate von 1,9 %. Vier Fälle (8 mit IHC 2+) von 161 (201) als negativ bewerteten Stanzbefunden waren im Resektat positiv, entsprechend einer Falsch-Negativ-Rate von 18 % (bzw. 31 % bei zusätzlicher Wertung der IHC 2+ Fälle als negativ).

Tabelle 3-9 Korrelation des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™

<i>HercepTest™</i>	<i>Resektat</i>				
<i>Stanze</i>	<i>0</i>	<i>1+</i>	<i>2+</i>	<i>3+</i>	<i>Total</i>
<i>0</i>	73	13	0	0	86
<i>1+</i>	43	32	11	4	90
<i>2+</i>	6	8	7	4	25
<i>3+</i>	2	1	0	18	21
<i>Total</i>	124	54	18	26	222

Tabelle 3-10 Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™

		95 % Konfidenzintervall
<i>Konkordanz</i>	0,59 (n=130)	0,52-0,65
<i>Weighted κ</i>	0,53	0,44-0,62

Bei Korrelation der HercepTest™-Ergebnisse von Stanze mit dem Resektat ergab sich eine Konkordanz von 58,6 % mit einem kappa von 0,53 (siehe Tabelle 3-10).

Tabelle 3-11 Korrelation des kategorialen HER2-Status von Stanze und Resektat mittels HercepTest™ (neg = 0; 1+; äqu = 2+; pos = 3+)

<i>HercepTest™</i>	<i>Resektat</i>			
<i>Stanze</i>	<i>neg</i>	<i>äqu</i>	<i>pos</i>	<i>Total</i>
<i>neg</i>	161	11	4	176
<i>äqu</i>	14	7	4	25
<i>pos</i>	3	0	18	21
<i>Total</i>	178	18	26	222

Tabelle 3-12 Übereinstimmung des kategorialen HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™

		95 % Konfidenzintervall
<i>Konkordanz</i>	0,84 (n=186)	0,78-0,88
<i>Weighted κ</i>	0,62	0,49-0,75

Bei rein kategorialer Betrachtung der Ergebnisse erhielten wir eine größere Übereinstimmung von 83,8 % mit einem kappa von 0,62 durch die Zusammenfassung der 0 und 1+ Resultate (siehe Tabelle 3-11 und 3-12).

Tabelle 3-13 Anteile Ergebnisse HercepTest™ in Stanze und Resektat (neg = 0; 1+; äqu = 2+; pos = 3+)

<i>HercepTest™</i>	<i>neg</i>	<i>äqu</i>	<i>pos</i>
Stanze	79,3 %	11,3 %	9,4 %
Resektat	80,2 %	8,1 %	11,7 %

Es zeigte sich ein Anteil der definitiven HER2-Positivität (HercepTest™ 3+) von 9,4 % im Stanzkollektiv und 11,7 % im Resektatkollektiv (siehe Tabelle 3-9). Beim Vergleich der HercepTest™-Ergebnisse gab es 17 kategorial diskordante Fälle, welche in der Stanze ein positives/äquivokes und im Resektat ein negatives Ergebnis erbrachten, sowie umgekehrt 15 Fälle (Tabelle 3-11). Davon waren jeweils nur zwei Fälle mit mindestens einem positiven Ergebnis in der ISH nachweisbar (Tabelle 3-14).

Tabelle 3-14 Darstellung der diskordanten Fälle bei Korrelation HercepTest Stanze vs. Resektat aus **Tabelle 3-11** mit mindestens einem positivem ISH-Ergebnis (n=4)

<i>HercepTest™</i>		<i>CISH</i>		<i>FISH</i>	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
1+	2+	neg	pos	neg	pos (4,3)
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos (2,53)
2+	0	pos	pos	pos (2,92)	pos (2,33)
3+	0	pos	pos	pos (3,99)	pos (2,38)

Bei Betrachtung von Tabelle 3-14 mit diesen 4 diskordanten Fällen wird ersichtlich, dass jene Fälle mit positivem HercepTest™-Ergebnis der Stanze in der IHC der Resektate keine positive Färbereaktion zeigten. Vermutlich kam im Resektat ein falsch negatives IHC Ergebnis zum Tragen. Bei den anderen beiden Fällen, zeigte sich in der Stanze zumindest eine Tendenz zur HER2-Expression. In diesen beiden Fällen fiel die immunhistochemische Färbereaktion in der Stanze schwächer und somit auch negativ aus, so dass man behaupten kann, dem positiven Ergebnis im Resektat lag ein wesentlicher Zugewinn an Tumorausschnitt zugrunde. Da es bei diesen Fällen auch eine Inhomogenität der ISH-Ergebnisse gab, sind eventuell die Expression und damit auch die HER2-Amplifikation ebenfalls auf die intratumorale

Heterogenität zurückzuführen. Bei Analyse der HER2/Chr.17 Ratio fiel zumindest fast durchweg eine Zahl im Bereich von 2,2-4,0 auf, welche zwar die Amplifikation bewies, aber doch im unteren Bereich („*low level amplification*“) lag und damit nahe der Grenze.

Tabelle 3-15 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™

HercepTest™	Resektat		
Stanze	0-2+	3+	Total
0-2+	193	8	201
3+	3	18	21
Total	196	26	222

Von den acht Fällen in Tabelle 3-15, die in der Stanze kleiner als score 3+ und im Resektat 3+ waren, zeigten nur die Fälle (n=4) in der ISH einen positiven Befund, die in der Stanze mit 2+ sowieso zu überprüfen wären. Alle anderen Fälle (n=4) waren demnach im Resektat möglicherweise falsch positiv. Innerhalb der anderen drei diskordanten Fälle aus Tabelle 3-15, die 3+ in der Stanze und kleiner 3+ im Resektat waren, befand sich kein 2+ Fall und nur ein Fall der ISH positiv war. Somit gab es auch auf Seite der Stanze zwei Fälle gegenüber 4 Fällen in der Resektatgruppe, die möglicherweise falsch positive Ergebnisse im HercepTest™ zeigten.

Tabelle 3-16 Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels HercepTest™

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,95 (n=211)	0,91-0,97
κ	0,74	0,59-0,89

Bei Reduktion bzw. Kategorisierung der Herceptest™score Ergebnisse auf 0-2+ und 3+ bei der Gegenüberstellung von Stanze und Resektat ergab sich eine Konkordanz von 95 % (siehe Tabelle 3-16). Diese Zuverlässigkeit der Aussage des HercepTests™ durch die Stanze wurde durch den *kappa*-Wert von 0,74 (siehe Tabelle 3-16) bestätigt. Spezifität, sowie der negativ prädiktive Wert (siehe Tabelle 3-17) erreichten sehr hohe Werte. Dagegen fielen die Sensitivität und der positiv prädiktive Wert als reduziert auf, was an den IHC 2+ Fällen der Stanze lag, die dem negativen Kollektiv zugeordnet wurden, aber im Regelfall eine Überprüfung mittels ISH erfahren (Tabelle 3-17).

Tabelle 3-17 Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status von Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels HercepTest™

		95 % Konfidenzintervall
Sensitivität	0,69	0,48-0,86
Spezifität	0,98	0,96-1,00
Positiv prädiktiver Wert	0,86	0,64-0,97
Negativ prädiktiver Wert	0,96	0,92-0,98

3.2.2 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse ergab sich ein Anteil der CISH HER2-positiven Resektate bei 27 Fällen von 12,8 % gegenüber 22 positiven Fällen in der Stanzgruppe (10,4 %).

Tabelle 3-18 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH

Stanze	Resektat		Total
	CISH-	CISH+	
CISH-	183	6	189
CISH+	1	21	22
Total	184	27	211

Bei Betrachtung der sieben diskordanten Fälle bei Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH (siehe Tab. 3-18) gab es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-19 Darstellung der diskordanten Fälle aus **Tabelle 3-18** Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH (n=7)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
0	0	pos	neg	pos (2,15)	neg
1+	0	neg	pos	pos (2,63)	pos (3,08)
1+	1+	neg	pos	neg	pos (3,9)
1+	1+	neg	pos	neg (1,83)	pos (2,81)
1+	2+	neg	pos	neg	pos (4,3)
3+	3+	neg	pos	pos (3,18)	pos (3,72)
3+	3+	neg	pos	neg	pos (3,2)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

In Tabelle 3-19 war die HER2/CEP-17 Ratio bei nachweisbarer Amplifikation noch im unteren Bereich bei maximal 4,3. Bei Bewertung der Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die CISH bei den 3+/3+ Fällen versagt hatte und daher ein falsch negatives Ergebnis zeigte. Es standen sechs Fälle mit einem positiven CISH Nachweis im Resektat einem Fall mit grenzwertig positiver Amplifikation in der Stanze gegenüber. Bei den fünf fettgedruckten Fällen (Tabelle 3-19) zeigte sich die Diskordanz zwischen Stanze und Resektat auch im Rahmen der FISH-Diagnostik bestätigt.

Bei Vergleich der CISH-Ergebnisse von Stanze und OP-Resektat fiel eine nahezu perfekte Übereinstimmung in 97 % der Fälle bei einem Kappa von 0,84 auf (Tabelle 3-20).

Tabelle 3-20 Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels CISH

		95 % Konfidenzintervall
<i>Konkordanz</i>	0,97 (n=201)	0,93-0,99
<i>κ</i>	0,84	0,72-0,96

Hinsichtlich der Validität der HER2-Bestimmung mittels CISH an der Stanze, erkennt man eine beeinträchtigte Sensitivität von 0,78, welche einer sehr guten Spezifität von 0,99 gegenübersteht (siehe Tab. 3-21).

Tabelle 3-21 Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status der Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels CISH

		95 % Konfidenzintervall
<i>Sensitivität</i>	0,78	0,58-0,91
<i>Spezifität</i>	0,99	0,97-1,00
<i>Positiv prädiktiver Wert</i>	0,95	0,77-1,00
<i>Negativ prädiktiver Wert</i>	0,97	0,93-0,99

3.2.3 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH

Ingesamt zeigten bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der FISH 15,7 % der Resektatfälle (29 /185) und 11,9 % der Stanzbiopate (22/185) eine HER2-Amplifikation.

Tabelle 3-22 Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH

Stanze	Resektat		Total
	FISH-	FISH+	
FISH-	155	8	163
FISH+	1	21	22
Total	156	29	185

Tabelle 3-23 Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,95 (n=176)	0,91-0,98
κ	0,80	0,67-0,92

Die Übereinstimmung des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels der FISH Methode wird bei einer Konkordanz von 95 % und einem *kappa*-Wert von 0,80 statistisch bestätigt (Tabelle 3-23). Bei einem kappa-Wert von 0,84 mit der CISH, könnte man behaupten, das die CISH die Methode mit der wahrscheinlich größten Übereinstimmung und damit Zuverlässigkeit des HER2-Status ist. Die Konfidenzintervalle der kappa Werte beider Methoden waren aber überlappend.

Tabelle 3-24 Darstellung der diskordanten Fälle aus **Tabelle 3-22** Korrelation des HER2-Status von Stanze und OP-Resektat mittels FISH (n=9)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
0	0	neg	neg	neg (1,57)	pos (2,2)
0	0	neg	neg	neg (1,83)	pos (2,3)
0	0	pos	neg	pos (2,15)	neg (1,17)
1+	1+	neg	neg	neg (1,65)	pos (2,31)
1+	1+	neg	pos	neg (1,29)	pos (3,9)
1+	1+	neg	pos	neg (1,83)	pos (2,81)
1+	2+	neg	pos	neg (1,37)	pos (4,3)
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos (2,53)
3+	3+	neg	pos	neg (0,99)	pos (3,7)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Die fünf fettgedruckten Fälle aus Tabelle 3-24 wiesen darauf hin, dass Stanz- und OP-Gewebe hier definitiv bei beiden ISH einen unterschiedlichen Amplifikationsstatus hatten. Hinsichtlich der Validität der FISH als diagnostischer Test (siehe Tab. 3-25) war die Sensitivität von 0,72 für die Stanze mit dem Wert der CISH vergleichbar. Bei Bestimmung des HER2-Status mittels ISH kamen bei der CISH der Resektate noch sechs von insgesamt 27 positiven Fällen gegenüber der Stanzbestimmung hinzu und bei der FISH noch acht von insgesamt 29 positiven Fällen. Dabei blieb nur ein Fall bei beiden unberücksichtigt, welcher lediglich in der Stanze ein positives Ergebnis zeigte.

Tabelle 3-25 Validität und Vorhersagewerte des HER2-Status der Stanze gegenüber dem OP-Resektat mittels FISH

		95 % Konfidenzintervall
Sensitivität	0,72	0,53-0,87
Spezifität	0,99	0,96-1,0
Positiver prädiktiver Wert	0,95	0,77-1,0
Negativer prädiktiver Wert	0,95	0,91-0,98

3.3 Vergleich der Methoden jeweils miteinander

3.3.1 Vergleich des HercepTest™ mit der CISH der Stanzbiopsie

Bei dem Vergleich des HercepTest™ mit der CISH der Stanzbiopsie zeigte sich bei einer guten Konkordanz von 94 % nur ein κ von 0,66 (Tabelle 3-27).

Tabelle 3-26 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH der Stanzbiopsie

CISH	HercepTest™ (3+)		Total
	-	+	
-	189	6	195
+	7	15	22
Total	196	21	217

Tabelle 3-27 Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH der Stanzbiopsie

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,94	0,9-0,97
κ	0,66	0,5-0,83

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle HercepTest™ (positiv = 3+) versus CISH (siehe Tab. 3-28) gibt es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-28 Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-26 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit CISH der Stanzbiopsie (n=13)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
3+	0	neg	neg	neg	neg
3+	1+	neg	neg	neg	neg
3+	3+	neg	neg	neg	neg
3+	3+	neg	neg	fehlt	neg
3+	3+	neg	pos	pos	pos
3+	3+	neg	pos	pos	pos
2+	0	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	neg	neg (1,83)
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos
0	0	pos	neg	pos	neg

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Es fällt auf, dass innerhalb der HercepTest™ 3+ Gruppe sich allein sechs Fälle nachweisen ließen (28,6 %), die mittels CISH keine Amplifikation zeigten (Tabelle 3-28). Nach Sichtung aller ISH Ergebnisse blieben davon vier Fälle übrig. Dies war ein Anteil von 19,05 % der definitiv überexprimierten Gruppe, welcher kein Korrelat auf DNA Ebene hatte. Daraus wurde ersichtlich, dass man nicht nur 2+ sondern auch die 3+ Fälle in die zusätzliche ISH-Diagnostik mit einbeziehen sollte. Dabei würde nur noch der letzte Fall aus der Erfassung herausfallen. Zusätzlich waren zwei von 173 Fällen der HercepTest Gruppe 0 und 1+ in der CISH amplifiziert. Dies entsprach einem geringen Anteil von 1,16 %.

3.3.2 Vergleich des HercepTest™ mit der FISH der Stanzbiopsie

Tabelle 3-29 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie

FISH	HercepTest™ (3+)		Total
	-	+	
-	176	4	180
+	6	16	22
Total	182	20	202

Tabelle 3-30 Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,95 (n=192)	0,91-0,98
K	0,73	0,58-0,89

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle HercepTest™ (positiv = 3+) versus FISH der Stanzbiopsie (siehe Tab. 3-31) gibt es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-31 Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-29 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH der Stanzbiopsie (n=10)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
2+	0	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
2+	3+	pos	pos	pos	pos
0	0	pos	neg	pos (2,15)	neg (1,17)
1+	0	neg	pos	pos (2,63)	pos (3,0)
3+	0	neg	neg	neg	neg
3+	1+	neg	neg	neg	neg
3+	3+	neg	neg	neg	neg
3+	3+	neg	pos	neg	pos (3,2)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio bei grenzwertig diskordanten Befunden)

Auch hier zeigten sich nur zwei Fälle von 162 in der HercepTest™ Gruppe (0 und 1+), die mit der FISH amplifiziert waren, was wie schon bei der CISH in der

Stanzgruppe einem größtmäßig ähnlichem Anteil von 1,23 % entsprach. In der 3+ HercepTest Gruppe fanden wir vier Fälle, welche mit der FISH keine Amplifikation zeigten. Somit entsprach dies einem Anteil von 20 %.

3.3.3 Vergleich des HercepTest™ mit der CISH des Resektates

Tabelle 3-32 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates

	<i>HercepTest™ (3+)</i>		
<i>CISH</i>	-	+	<i>Total</i>
-	183	6	189
+	7	20	27
Total	190	26	216

Tabelle 3-33 Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,94	0,9-0,97
κ	0,72	0,58-0,86

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle HercepTest™ (positiv = 3+) versus CISH des Resektates (siehe Tab. 3-34) gibt es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-34 Darstellung der diskordanten Fälle aus **Tabelle 3-32** Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der CISH des Resektates (n=13)

<i>HercepTest™</i>		<i>CISH</i>		<i>FISH</i>	
<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>
3+	3+	neg	neg	fehlt	neg
3+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	fehlt	neg	fehlt	fehlt
3+	0	pos	pos	pos	pos
2+	0	pos	pos	pos	pos
1+	0	neg	pos	pos (2,63)	pos (3,0)
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos (2,53)
1+	2+	neg	pos	neg	pos (4,3)

1+	1+	neg	pos	neg	pos (3,9)
1+	1+	neg	pos	neg (1,83)	pos (2,81)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Abermals zeigte sich ein geringer Anteil von 2,87 % der 0 und 1+ HercepTest Gruppe (5/174 Fällen) in der Amplifikation positiv. Dem standen sechs Fälle von 26 (23,08 %) gegenüber, die überexprimiert waren, aber keine Amplifikation zeigten. Lediglich zwei von 16 Fällen (12,5 %) der 2+ exprimierten Gruppe wiesen mittels CISH eine HER2-Amplifikation auf.

3.3.4 Vergleich des HercepTest™ mit der FISH des Resektates

Tabelle 3-35 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates

<i>FISH</i>	<i>HercepTest™ (3+)</i>		
	-	+	<i>Total</i>
-	158	6	164
+	10	19	29
<i>Total</i>	168	25	193

Tabelle 3-36 Übereinstimmung des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates

		95 % Konfidenzintervall
<i>Konkordanz</i>	0,92 (n=177)	0,87-0,95
<i>κ</i>	0,66	0,50-0,81

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle HercepTest™ (positiv = 3+) *versus* FISH des Resektates (siehe Tab. 3-37) gibt es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-37 Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-35 Assoziation des HercepTest™ (positiv = 3+) mit der FISH des Resektates (n=16)

<i>HercepTest™</i>		<i>CISH</i>		<i>FISH</i>	
<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>	<i>Stanze</i>	<i>Resektat</i>
3+	0	pos	pos	pos	pos
2+	0	pos	pos	pos	pos
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos (2,53)
1+	0	neg	pos	pos (2,63)	pos (3,0)

1+	1+	neg	pos	neg (1,83)	pos (2,81)
1+	1+	neg	pos	neg (1,29)	pos (3,9)
1+	2+	neg	pos	neg (1,37)	pos (4,3)
1+	1+	neg	neg	neg (1,65)	pos (2,31)
0	0	neg	neg	neg (1,83)	pos (2,33)
0	0	neg	neg	neg (1,57)	pos (2,2)
2+	3+	pos	pos	neg (1,23)	neg (1,85)
3+	3+	neg	neg	fehlt	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
1+	3+	neg	neg	neg	neg
3+	3+	neg	neg	neg	neg

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Bei Korrelation der HercepTest- mit den FISH-Ergebnissen der Resektate zeigten sich zwei von 14 Fällen der 2+ HercepTest™-Gruppe amplifiziert (14,29 %). In der 0 und 1+ Gruppe waren dies acht von 154 Fällen (5,19 %). Anteilig waren 2,4 % (Werte von 1,2-4,8 %) der Gruppe der HercepTest™ 0 ISH positiv. Innerhalb der Gruppe der HercepTest™ 1+ waren 3,1 % positiv mittels ISH (Werte von 1,1-6,1 %). Und schließlich in der Gruppe HercepTest™ 2+ fanden sich nur 16,7 % ISH-positive Fälle. Innerhalb der 3+ Gruppe waren dabei sechs Fälle von 25 nicht amplifiziert (24 %). Nach Sichtung der IHC 2+ und 3+ Fälle innerhalb des Stanz- und Resektatkollektives waren in der Stanze 17 Fälle der 3+ Gruppe und fünf Fälle der 2+ Gruppe durch die ISH Ergebnisse als HER2 positiv bestätigt wurden (insgesamt 22 Fälle von 46 Fällen). In der Resektatgruppe waren 20 innerhalb der 3+ Fälle und zwei innerhalb der 2+ Fälle durch die ISH bestätigt wurden und damit ebenfalls insgesamt 22 Fälle hierbei von 44 Fällen. Von diesen 22 Fällen waren 20 in beiden Gruppen in dieser amplifizierten/überexprimiert oder äquivoken Gruppe enthalten.

3.3.5 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie

Tabelle 3-38 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie

FISH	CISH		Total
	-	+	
-	177	2	179
+	2	20	22
Total	179	22	201

Tabelle 3-39 Übereinstimmung des HER2-Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,98 (n=197)	0,95-0,99
κ	0,90	0,8-1,0

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle gab es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-40 Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-38 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH der Stanzbiopsie (n=4)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
3+	3+	neg	pos	pos (3,18)	pos (3,72)
1+	0	neg	pos	pos (2,63)	pos (3,08)
2+	3+	pos	pos	neg (1,23)	neg (1,85)
1+	2+	pos	pos	neg (1,95)	pos (2,53)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Die ersten zwei Fälle ließen vermuten, dass die CISH bezüglich der Stanze dort versagt hatte. Andererseits zeigten beide Fälle eine Amplifikation im *low level* Bereich. Auch die anderen zwei Fälle zeigten grenzwertige Befunde, deren Diskordanz sich darin begründete.

3.3.6 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH des Resektates

Tabelle 3-41 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH des Resektates

	CISH		
FISH	-	+	Total
-	163	1	164
+	3	26	29
Total	166	27	193

Tabelle 3-42 Übereinstimmung des HER2-Status mittels CISH und FISH des Resektates

		95 % Konfidenzintervall
Konkordanz	0,98 (n=189)	0,94-0,99
κ	0,92	0,84-1,0

Bei Betrachtung der diskordanten Fälle CISH *versus* FISH des Resektates (siehe Tab. 3-43) gibt es folgende Kombinationen:

Tabelle 3-43 Darstellung der diskordanten Fälle aus Tabelle 3-41 Assoziation des HER2-Status mittels CISH und FISH des Resektates (n=4)

HercepTest™		CISH		FISH	
Stanze	Resektat	Stanze	Resektat	Stanze	Resektat
0	0	neg	neg	neg (1,57)	pos (2,2)
0	0	neg	neg	neg (1,83)	pos (2,33)
1+	1+	neg	neg	neg (1,65)	pos (2,31)
2+	3+	pos	pos	neg (1,23)	neg (1,85)

(neg = keine Amplifikation HER2; pos = positive Amplifikation HER2; in Klammern HER2/CEP17-Ratio)

Die Korrelation von CISH mit FISH war mit einem κ von 0,92 innerhalb der Resektatgruppe am größten (Tabelle 3-42). Man konnte dabei von einer fast perfekten Übereinstimmung ausgehen. Wobei die drei Fälle, die in der FISH zusätzlich positiv waren, auch nur grenzwertige HER2/Chr.17 Ratios im Resektat hatten und damit im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Testmethoden zu hinterfragen wären (Tabelle 3-43). Im vollständigen Resektatkollektiv (alle Ergebnisse der ISH gegeben) war der Anteil an HER2-Positivität mit maximal 14 % bzw. 15 % bei der FISH und CISH am größten. Dem standen lediglich 12 % der HER2 positiven Stanzen gegenüber.

Bei Auswertung des Gesamtkollektives bezüglich der Fälle IHC 3+ und/oder ISH+ ergaben sich 40 HER2 positive Fälle unter den insgesamt 222 Fällen. Dies entspricht einem Anteil von 18 %. Bei Betrachtung der Stanzergebnisse ergab sich ein Anteil von 13,1 %, sowie bei den Resektatergebnissen von 16,2 % mit IHC 3+ und/oder ISH+.

3.3.7 Weitere Assoziation des HER2-Status/Sonderfälle

Innerhalb der in Stanze und Resektat bestätigten G1 Tumore (n=36 Fälle) fand sich nur ein HER2 amplifizierter Fall: 1+/0 np (2,63) pp (3,0). Die Amplifikation war sowohl in der Stanze als auch im Resektat nachweisbar. Zusätzlich war dieser Fall hormonrezeptorpositiv (ER+ IRS 12/PgR+ IRS 6).

In der Untergruppe der 24 lobulären Karzinomen gab es einen Fall, der in beiden Gewebeproben im HercepTest™ 3+, sowie in der ISH komplett negativ und bezüglich ER/PgR positiv war. Ein weiterer zeigte lediglich mit der ISH im Resektat eine HER2-Amplifikation (1+/1+ nn (1,29) pp (3,9) ER+/PgR+).

In den 15 Fällen, die im Resektat ER IRS 12/PgR IRS 12 waren, also hoch Hormonrezeptor-positiv waren, gab es keinen Nachweis einer HER2-Amplifikation, jedoch zwei Fälle die mittels HercepTest™ 3+ im Resektat, aber nur 1+ in der Stanze zeigten.

Betrachtet man die 24 Fälle, die in der Stanze ER und PgR IRS 12 waren, gab es bezüglich HER2 nur den einen grenzwertig amplifizierten Fall 1+/2+ pn(1,95)pp (2,53), sowie einen Fall, welcher lediglich im HercepTest™ in der Stanze 3+ aufwies. Dieser zeigte im Resektat gar keine Anfärbung beim HercepTest™ 0. Auch hier gab es zwei Fälle, welche im Resektat einen HercepTest™ von 3+ gegenüber 1+ in der Stanze aufwiesen. Bei Reduktion auf die sieben Fälle welche in Stanze und Resektat ER /PgR IRS 12 waren, blieb nur ein Fall übrig, welcher im Resektat 3+ und in der Stanze 1+ war. Ein amplifizierter Fall war nicht darunter.

4 DISKUSSION

4.1 Aktueller Testalgorithmus HER2

Die Zuverlässigkeit der Bestimmung der Tumoreigenschaften aus der Stanze oder dem zugehörigem Resektat beim Mammakarzinom ist von enormer Wichtigkeit. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für die Auswahl der geeigneten Therapie für die einzelne Patientin. Der Bestimmung der Hormonrezeptoren und der HER2-Expression/Amplifikation kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. In der hier vorgelegten retrospektiven Studie wurde der Bestimmungsalgorithmus des HER2-Status mit den verschiedenen Methoden, als auch anhand der zwei Gewebeproben näher evaluiert. Trotz der erheblichen wissenschaftlichen und therapeutischen Bedeutung, gibt es gegenwärtig keine Studie, die mit einer ähnlichen Fallzahl aus einem monozentrischen Kollektiv und in diesem Umfang das Thema untersucht hat. Besondere Bedeutung hat die Verlässlichkeit der Bestimmung aus Stanzbiopsien, da bei HER2-positiver Erkrankung die neoadjuvante Therapie eine bevorzugte Therapieoption darstellt. Nachdem Buzdar et al., 2005 erstmals eine deutliche Besserung der neoadjuvanten Ansprechrate durch Hinzunahme von Trastuzumab zeigen konnten [128], wurde dies bei Verbesserung der Rate der pathologischen Komplettremissionen von 15,7 % auf 31,7 % in der GeparQuattro-Studie (Phase III) betätigt [129] wie auch in der NOAH-Studie (Phase III) mit einer Steigerung von 22 % auf 43 % [130]. Erste Ergebnisse der NEO-ALTTO (Phase III-Studie) zeigten nach neoadjuvanter Therapie eine pathologische Komplettremission bei Hinzunahme der Kombination von Trastuzumab mit Lapatinib in 51,3 % gegenüber der Hälfte bei Monotherapie mit den Substanzen [131]. Auch im Rahmen der CHER-LOB Phase II Studie wurden bei dieser Kombination ähnliche Anteile der Komplettremission beschrieben [132]. Dabei wurde die pathologische Komplettremission als Prognoseparameter bestätigt [133].

Ein positiver HER2-Status besteht bei einer immunhistochemischen Überexpression von 3+ und/oder einer mittels ISH nachgewiesenen Amplifikation des Gens. Bei Vorliegen eines schwach positiven Ergebnisses (IHC 2+) in der Immunhistochemie ist der Amplifikationsnachweis zusätzlich nötig, da lediglich 15-48 % dieser Befunde tatsächlich amplifiziert sein sollen [134, 135]. Im Rahmen unsere Studie ergab sich dafür ein Durchschnittswert von 19 %. Die deutschen als auch die amerikanischen ASCO/CAP Leitlinien verlangen erst die Durchführung der IHC und lediglich bei IHC 2+ Ergebnis die zusätzliche Durchführung einer ISH [45, 46, 136]. Im Durchschnitt

waren 24 % der HercepTest™ 3+ Fälle unseres Kollektives ISH negativ. Andere Autoren beschrieben einen Anteil von 5-22 % nicht amplifizierten Proben innerhalb der 3+ Gruppe und propagieren deshalb auch die Überprüfung der IHC 3+ Befunde mittels ISH [134, 135, 137]. Auch eine alleinige Durchführung einer ISH steht zur Diskussion [45], da selbst in der Gruppe der IHC 0 und 1+ zwischen 2-8 % amplifiziert sein können [134, 135]. In unserem Kollektiv zeigten 1,16-5,19 % (gemittelt: 2,61 %) der Fälle dieser Untergruppe eine Amplifikation. Schon Press et al. 1997 und Persons et al. 2000 postulierten die höhere Spezifität und Sensitivität der HER2-Bestimmung mittels FISH gegenüber der IHC [48, 138]. Schließlich forderten auch klinische Studien eine Bestätigung des positiven HER2-Status durch eine zentrale ISH-Testung [139, 140]. Ebenso gibt es Empfehlungen bestimmter Länder (z.B. Australien) und Institutionen generell nur nach positiver ISH-Testung eine HER2 gerichtete Therapie zu veranlassen [141-144]

Die Vorgehensweise bei der Analyse des HER2-Status bei Vorliegen einer Stanze und des zugehörigen Resektates bei Mammakarzinompatienten, insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen ist nicht definitiv geklärt. Wie beschrieben ist die Verlässlichkeit der Diagnose aus der Stanzbiopsie bei neoadjuvanten Therapieansatz von großer Bedeutung. Insbesondere auch bei Auftreten einer pathologischen Komplettremission. Eine Änderung des Tumorprofils ist bei aktueller Datenlage ebenfalls nicht auszuschließen [145]. Auch das „Wegstanzen“ und damit die komplette Entfernung des Tumors durch die Stanzbiopsie kann nicht ausgeschlossen werden. Daher muß man bei neoadjuvanten Therapievorgehen auf die Diagnose aus der Stanze vertrauen und diese ohnehin durch das Resektat erneut überprüfen [145]. Für die Bestimmung aus der Stanze spricht, die oft beschriebene bessere Fixierung [146, 147] und eine Entnahme zumeist aus der Invasionsfront [148]. Dem steht der Vorteil des Resektates einen doch größeren und damit repräsentativeren Tumorausschnitt zeigen zu können gegenüber.

Die ASCO/CAP Leitlinien verlangten 2007 außerdem die Beschränkung der Immunhistochemie von IHC 3+ auf die Fälle mit mehr als 30 % einheitlich intensiv angefärbten Zellen [45]. Dies konnte sich jedoch noch nicht generell durchsetzen, da die Überprüfung dieser These durch eine Korrelation mit dem Therapieansprechen noch aussteht [120, 149]. Die Korrelation der IHC mit der FISH soll sich durch die empfohlene Änderung aber deutlich verbessern [150-152]. Dies erklärt sich dadurch, dass mehr 3+ Fälle der 2+ Gruppe zugeordnet werden. Studien die bei guter Fallzahl die alten Dako Richtlinien den ASCO/CAP Richtlinien zur Festlegung des IHC *scoring* in Korrelation zur FISH gegenüberstellten, konnten keinen wesentlichen Unterschied feststellen [153, 154].

Kontrovers ist auch, ab welchem Ergebnis der Mono-ISH (nur die Sonde für die HER2-Region) von einer Amplifikation des HER2 Gens auszugehen ist. Die Mehrzahl entsprechender Studien setzt eine Grenze von ≥ 6 Kernsignalen in der CISH für eine eindeutige Amplifikation des HER2-Gens fest [121-123]. Andere Autoren akzeptieren bei der Durchführung einer ISH mit nur einer Sonde für HER2 die Amplifikation erst ab 7 Kernsignalen. Hierbei wird empfohlen, die nur 4-6 Signal gebenden Karzinome zusätzlich mit einer Zentromer-Chromosom 17 Sonde zu untersuchen, um eine mögliche Polyploidie, die in diesem Bereich häufiger vorkommt, auszuschließen [45, 155, 156]. Bei Durchführung einer ISH mit der zusätzlichen Sonde für das Chromosom 17 Zentromer geht man einerseits ab einer HER2/CEP17-Ratio von 2,0 von einer Amplifikation aus. Zum Anderen wird jedoch ein Verhältnis von 1,8-2,2 als äquivoker Bereich definiert. Dieses Ergebnis muss dann mittels einer Auszählung weiterer 20 Zellen oder einer erneuten Untersuchung überprüft werden. Letztendlich gibt es für die bleibend äquivoken Fälle keine Festlegung, wie hinsichtlich einer möglichen Therapie entschieden werden soll [45, 124, 157]. Bezüglich einer Klassifizierung in niedrig (*low level*), mittelgradig (*intermediate level*), sowie hoch (*high level*) amplifiziert findet man ebenfalls keine einheitliche Regelung, obwohl die Unterteilung häufig vorgenommen wird [158-161]. Die FISH-Methode wurde häufig als Goldstandard angesehen [134, 162, 163]. Diese Ansicht teilen jedoch nicht alle Autoren [45, 164].

4.2 Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen

Da zumeist das Resektat zur Bestimmung des HER2-Status verwendet wird, haben wir neben der Korrelation der Ergebnisse von Stanze und Resektat auch die Überprüfung der Stanzergebnisse gegenüber dem angenommenen Goldstandard des Resektates durchgeführt.

Der Anteil der HER2-Positivität mit dem HercepTest™ Ergebnis 3+ lag bei 9,5 % (21/222) im Stanzkollektiv und 11,7 % (26/222) im Resektatkollektiv. Im Rahmen der CISH Diagnostik zeigten sich 10,1 % (22/217) für die Stanze und 12,5 % (27/216) für die Resektate HER2 positiv. Der Anteil an HER2 positiven Fällen mit der FISH ergab 15 % (29/193) innerhalb des Resektatkollektives und 10,9 % (22/202) innerhalb der Stanzgruppe. Dabei wird der tatsächliche Anteil HER2-Positivität unserer Klinik sicher geringfügig höher sein, da bestimmte Fälle nicht in der vorliegenden Studie erfasst wurden. Aufgrund der Verschickung von Gewebeblöcken von Patienten, die an anderen Studien teilnahmen (Studien: GeparQuattro, GAIN, HERA, [162, 165, 166]) war es in 15 Fällen nicht möglich

ausreichend Gewebe für unser Vorhaben vorzuweisen. Außerdem hatten wir Fälle, die einer neoadjuvanten oder palliativen Therapie zugeführt wurden, nicht in die vorliegende Studie eingeschlossen. Zum einen die neoadjuvanten Fälle, da 1) unter Therapie eine Änderung im Tumorprofil nicht auszuschließen ist und 2) bei palliativem Ansatz die Fälle ohne Stanze und/oder ohne korrelierendes Resektat. Insgesamt entsprachen unsere Werte unter Berücksichtigung des Erfassungsfehlers sicherlich den relativ niedrigen statistisch erfassten Werten des Gesamtkollektivs unserer Klinik der Jahre 2003-2008 mit einer HER2-Positivität von 15,86 % [167]. Dabei wurde in 40 % der IHC 2+ Fälle kein ISH-Ergebnis angegeben. Demnach befindet sich unser Anteil HER2 positiver Fälle (40/222; 18 %, unter Einbeziehung aller Fälle IHC3+ und/oder ISH+; nur Stanzergebnisse: 13,1 %; nur Resektatergebnisse: 16,2 %) im vorbeschriebenen Anteil für HER2-Positivität [33, 34, 168, 169]. Dabei ist die Studie von Liebrich et al. für unser Kollektiv am repräsentativsten, da sie sich auf 4651 Patienten in Sachsen auf das Jahr 2007 bezog. Die Kollegen beschrieben bei diesem aktuellen großen Kollektiv einen ähnlichen Anteil von 17,5 % HER2 positiver Patienten mit IHC 3+ und/oder ISH+.

4.2.1 Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich des HercepTest™

Die Korrelation des HER2-Status der Stanzbiopsie mit dem Resektat ergab eine nur mäßige Übereinstimmung. Bei Zusammenfassung der Gruppe mit IHC 0 und 1+ wurde diese zuverlässiger. Bei der Betrachtung der Einzelergebnisse des HercepTest™ fanden sich in der Stanzgruppe 60 Fälle, bei denen das Scoring höher als im Resektat war. Diesen standen 32 Fälle gegenüber, bei denen das Scoring des Resektates höher ausfiel. Dadurch kann man eine bessere Anfärbung des HercepTest™ im Stanzkollektiv vermuten. In der Gruppe der diskordanten Fallpaare gab es lediglich vier Paare, die in der ISH ein positives Ergebnis zeigten. Dies würde insgesamt doch für eine hohe Rate falsch positiver Anfärbungen der HercepTest™ -Befunde sprechen. Betrachtet man aber die restlichen diskordanten Fälle, zeigten sich dabei nur wenige final falsch positive Befunde, wenn man sie entsprechend dem aktuellen Algorithmus durch die ISH überprüfte. Dabei konnten wir bei Prüfung mit der ISH zwei potentiell falsch positive (HercepTest™ 3+; ISH negativ) Fälle im Stanzkollektiv gegenüber vier in der Resektatgruppe aufzeigen. Eine bessere und vollständigere Fixierung des Stanzkollektivs ist dabei eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis [170]. Eine mögliche Unterschreitung der minimalen Fixierungszeit bei den Stanzen, die manche Autoren anführen [171], ließ

sich bei unseren Präparaten durch eine klare zeitliche Regelung (Stanze mindestens 2 Stunden, Resektat zwischen 6-48 Stunden) ausschließen. Unsere Fixierungszeiten entsprachen somit den Vorgaben aus der ASCO/CAP Leitlinie [45]. Demgegenüber kann man das Risiko falsch positiver Anfärbungen durch genaue morphologische Untersuchung der gesamten Stanze minimieren [137, 172], so dass Mann et al. (2005) die Stanzbiopsie zusammenfassend als zuverlässig in ihrer Vorhersage des HER2-Status bewerten [170].

Wesentlicher Nachteil der Stanze ist, dass nur ein kleiner Tumoranteil repräsentiert wird. Dieser kann in seltenen Fällen so gering sein, dass eine zusätzliche Rezeptorbestimmung unmöglich ist. Daher ist bei potentiell heterogenem Tumor die Evaluierung mehrerer Stanzbiopsate für eine repräsentative Diagnose empfohlen. Dabei variiert die optimale Anzahl an Stanzen aus dem Tumor, um eine möglichst repräsentative Diagnose bieten zu können, von zwei Stanzen [173] über drei Stanzen [174] bis hin zur Forderung nach mindestens 6 Stanzen [136, 175, 176], sowie auch in Abhängigkeit vom Durchmesser des Stanzzylinders [136, 177]. Die erste Studie, die dabei auch die Prognoseparameter wie HER2, ER und PgR mit einbezog, fordert mindestens vier Stanzen zu untersuchen [178]. Wir konnten in unserer Studie auf durchschnittlich drei Stanzzylinder von 10, 11 oder 14 Gauge zur Diagnosesicherung zurückgreifen. Dabei bestätigten mindestens zwei der drei Stanzzylinder ein positives Ergebnis, wenngleich eine detaillierte Auswertung diesbezüglich nicht Bestandteil unserer Arbeit ist.

Die Übereinstimmung zwischen Stanz- und OP-Ergebnis bezüglich des HercepTest™ war nur bei Beschränkung der HER2-Positivgruppe auf die HER2 3+ Fälle im Vergleich zu den restlichen Fällen verlässlich. Es ergab sich ein kappa von 0,74 bei einer guten Konkordanz von 95 %. Dabei ist bekannt, dass die Konkordanz selbst bei Interobserververgleich bezüglich der HercepTest™-Ergebnisse in Studien nur bei maximal 80-90 % lag [134, 162]. Der Nachweis des größeren Anteils an HER2-Positivität innerhalb des Resektatkollektives spricht für einen Vorteil des OP-Resektates.

Andererseits fanden wir bei Durchsicht der 32 kategorial diskordanten Fälle auf beiden Seiten nur zwei Fälle, die im Rahmen der ISH ein positives Ergebnis aufweisen können. Außerdem fielen bei Durchsicht der Gruppe 2+/3+ 22 Fälle (von insgesamt 46 Fällen dieser Gruppe) innerhalb der Stanzen gegenüber 22 Fällen innerhalb der Resektate (von insgesamt 44 Fällen) auf, die durch die ISH-Ergebnisse als positiv bestätigt wurden. Dies lässt daran zweifeln, dass das Resektat bei der IHC wirklich Vorteile bietet und verstärkt die Zuverlässigkeit der Bestimmung anhand der Stanzbiopsie trotz der geringen Sensitivität und positiven

Prädiktion bei Bestimmung des HER2-Status aus der Stanze. Bei ausgesprochener Tumorheterogenität bietet die zweizeitige Bestimmung in beiden Geweben den Vorteil, den HER2-Status noch sicherer definieren zu können. Zum Ausschluss einer fehlerhaften Therapieentscheidung aufgrund falscher IHC-Ergebnisse sind demgegenüber zur Überprüfung des Ergebnisses die ISH-Methoden verfügbar. Dies wird bei Sicht auf die deutlich zuverlässigeren Aussagen durch die ISH noch unterstützt.

4.2.2 Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der CISH - Methode

Bei Betrachtung der Korrelation der CISH-Ergebnisse miteinander zeigte sich bei einem *kappa* von 0,84 eine sehr große und damit zuverlässige Übereinstimmung der Ergebnisse von Stanze und Resektat. Im Gegensatz zu der sehr hohen Spezifität von 0,99 lag die Sensitivität aber nur bei 0,78. Dies bedeutet, dass durch die Diagnosesicherung anhand der Stanze der Anteil der als richtig erkannten HER2 Negativen sehr hoch ist. Jedoch fand die Stanze nur 78 % der Fälle, die durch das Resektat als HER2 positiv definiert waren. Dies bedeutet für die HER2-Detektion mittels CISH anhand der Resektate einen Zugewinn HER2 positiver Fälle. Kann das Ergebnis des Resektates dabei wirklich als Goldstandard angesehen werden? Dies müsste vergleichend mit der Korrelation des Therapieansprechens gezeigt werden. Die guten prädiktiven Werte bestätigen allerdings die Zuverlässigkeit der Ergebnisse anhand der Stanzbiopsie. Das Missverhältnis zwischen HER2 positiver und negativer Fallzahl barg bei geringer absoluter Fallzahl der HER2 Positiven Schwierigkeiten in der Bewertung der Ergebnisse. Dadurch beeinflusste auf Seite der HER2 Positiven ein diskrepanter Fall viel stärker die Kalkulation.

4.2.3 Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der FISH Methode

Die Korrelation der FISH-Ergebnisse von Stanze und Resektat wies bei einem *kappa* von 0,8 ebenfalls eine hohe Übereinstimmung auf, wenn diese auch etwas schwächer als bei der CISH ausfiel. Bei Überprüfung der Stanzergebnisse mittels der Ergebnisse aus dem entsprechenden Resektat erzielte man die gleiche Spezifität von 0,99 bei einer noch geringeren Sensitivität von 0,72 im Vergleich zur CISH. Da mittels Bestimmung anhand des Resektates auch im Rahmen der FISH zusätzliche HER2 positive Fälle detektiert wurden, kann man von einem Vorteil der

Bestimmung aus dem Resektat ausgehen. Die prädiktiven Werte zeigten eine relativ zuverlässige Bestimmung der FISH durch die Stanze an.

Insgesamt können beide ISH-Methoden in ihrer Vorhersagekraft durch das Biopsieergebnis als vergleichbar bewertet werden, wobei die CISH bei unserer Datenlage als geringfügig präziser einzuschätzen ist.

Generell zeigte sich, dass bei beiden ISH Methoden mit der Bestimmung aus dem Resektat gegenüber der Stanze zusätzliche HER2 positive Fälle detektiert wurden. Diese Fälle waren zum größten Anteil in der CISH und FISH positiv. Dabei waren viele diskordante Fälle in ihrer HER2/CEP17-Ratio grenzwertig oder niedrig amplifiziert. Eine Beobachtung, die auch schon andere Autoren gemacht haben [179]. Bei der Durchsicht dieser Fälle erschien die Anfärbung auch in sich bezüglich des HER2-Status relativ heterogen.

4.2.4 Vergleich der Biopsie- mit den Resektat-Ergebnissen bezüglich der Steroidrezeptoren

Die Korrelation des Östrogenrezeptor-Status von Stanze und Resektat war mit einem *kappa* von 0,79 nahezu perfekt bei einer Konkordanz von 94 %. Dies bedeutet, dass man durchaus auf die Vorhersage des Östrogenrezeptors durch die Stanze vertrauen kann. Wenn nicht sogar die Stanze Vorteile gegenüber dem Resektat bietet, vor allem weil man anteilig mehr positive Stanzfälle gegenüber der Resektatgruppe fand. Dies begründen Mann et al. (2005) mit der besseren Fixierung der Stanzgewebe und demnach besseren Konservierung des entsprechenden Epitops [170]. Die einzigen drei Hormonrezeptor-positiven Fälle, welche nicht durch den Östrogenrezeptor der Stanze detektiert wurden, wären bei Überprüfung mit dem Progesteronrezeptor in beiden Gewebetypen aufgefallen.

Bei dem Vergleich des Progesteronrezeptor-Status der Stanze mit dem Resektat ergab sich ein *kappa* von 0,7. Damit fiel die Vorhersage bezüglich des Progesteronrezeptors durch die Stanzbiopsie gering schlechter als im Rahmen der Östrogenrezeptordiagnostik (*kappa* 0,79) aus. Dies kann mit der sehr heterogenen Verteilung des Progesteronrezeptors zusammenhängen [180]. Der Anteil PgR positiver Fälle war bei beiden Gewebetypen identisch (64,8 %). Die Anteile beider (83,3 % ER pos Stanze, 78,9 % ER pos Resektat) Steroidrezeptoren entsprachen damit den Angaben zum Mammakarzinom aus der Literatur [158, 181]. Bei Durchsicht der ER negativen Fälle in einem Gewebetyp und Kontrolle mittels PgR, zeigte sich durchweg bei positivem PgR Resektat Befund ein Anhalt für daraus abzuleitende Hormonrezeptorpositivität durch Hinzunahme der anderen Befunde.

Trotz der vorliegenden eingeschränkten Stichprobe könnte man die These ableiten, die Östrogenrezeptorbestimmung aus dem Stanzgewebe vorzunehmen und mit der Progesteronrezeptor-Bestimmung aus dem Resektat gegen zutesten. Damit würde man weitestgehend alle Hormonrezeptor-positiven Fälle detektieren, da man bei diskrepantem Befund weiter untersuchen könnte. Dies müßte aber an einem größeren Kollektiv prospektiv überprüft werden. Darüber hinaus empfehlen Autoren generell alle hormonrezeptornegativen Stenzen weiter zu überprüfen [182]. Aktueller Algorithmus an unserer Klinik war bis dato sowohl ER als auch PgR anhand beider Gewebetypen zu bestimmen.

4.2.5 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden

Bei der Gegenüberstellung der drei Methoden zeichnen sich deutliche Unterschiede ab. Der HercepTest™, generell die IHC bietet die kostengünstigste Analyse. Es bleiben aber immer die äquivoken 2+ Fälle, welche zusätzlich mittels einer ISH zu überprüfen sind. Diese Gruppe weist häufiger heterogene Tumoren auf [183]. Auch eine Polyploidie des Chromosom 17 soll dort vermehrt auftreten [184]. Aufgrund unserer Ergebnisse ist die Prüfung der 3+ Ergebnisse ebenfalls zu erwägen, da in dieser Gruppe bis zu 28,6 % ISH negativ waren. Da das Ansprechen dieser Fälle ungewiss ist, könnte man diese Fälle eventuell mittels Zweitmeinung retesten lassen. Bei fortbestehender Diskrepanz der Ergebnisse wäre die interdisziplinäre Beurteilung und Aufklärung des Patienten möglich. Den Kosten der HER2-Detektion stehen bei falsch positiven Ergebnissen natürlich die Kosten der Therapie und ihre entsprechenden potentiellen Nebenwirkungen gegenüber. In einer amerikanischen Kostenanalyse von Elkin et al. (2004), die bei Einsatz von Trastuzumab bei metastasiertem Mammakarzinom, die Ergebnisse aus 10 Studien einbezog, kam man ebenfalls zu dem Ergebnis auch die IHC 3+ Fälle mit FISH zu überprüfen [185]. Dies konnte auch durch eine Metaanalyse aus 17 Studien von Dendukuri et al. (2007) bei Einsatz von Trastuzumab bei Mammakarzinom bestätigt werden [134]. Beide Studien gingen dabei von einem Nichtansprechen der FISH neg./IHC pos. (3+) Fälle aus.

Die semiquantitative Beurteilung der Anfärbung in der IHC ist mit einem größeren möglichen subjektiven Fehler behaftet. Das Auszählen von Kernsignalen bei den ISH-Methoden erlaubt hingegen eine objektivere Auswertung. Auch die Fixierung des Gewebes hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Anfärbung durch die IHC [45]. Das HER2-Oberflächenantigen ist dabei dem Nachweis gegenüber instabiler als die DNA. Generell muss man darauf verweisen, dass unsere durchgeführten Bestimmungsmethoden entgegen der ASCO/CAP Leitlinie zumeist deutlich später

als sechs Wochen nach Gewebeentnahme erfolgten, was zu einem Verlust des Epitopes führen kann [45].

4.2.6 Vergleich CISH mit FISH

Der HER2-Nachweis mittels in situ Hybridisierung verursacht bis zu vierfach höhere Kosten wie die IHC und ist deutlich zeitaufwändiger und anspruchsvoller in der Durchführung. Dabei ist die CISH die schnellere und weniger störanfällige der beiden ISH-Verfahren. Auch die Auswertung der CISH ist aufgrund der zeitgleich evaluierbaren Histomorphologie mittels lichtmikroskopischer Ansicht und der möglichen Archivierung günstiger als bei der FISH. Die Auswertung der FISH-Analyse erfordert ein Fluoreszenzmikroskop mit entsprechender Kamera, wobei die zeitgleiche Beurteilung der Histomorphologie nicht möglich ist.

Zu Beginn unserer Analyse 2006 war die CISH noch nicht allgemein anerkannt. Mittlerweile liegen bereits etliche Studien wie in Tabelle 4-1 dargestellt zu ihrer Evaluation vor, womit als Beginn die Studie von Tanner et al. 2000 genannt werden muss.

Tabelle 4-1 Studienergebnisse mit Vergleich von CISH und FISH

<i>Studie</i>	<i>Fallgröße</i>	<i>CISH/FISH Konkordanz in %</i>	<i>kappa</i>
Arnould et al., 2003 [122]	75	96	0,97
Arnould et al. 2012 (CISH Stanze/FISH OP) [153]	234	98	0,96
Bhargava et al. 2005[186]	102	100	-
Bilous et al. 2004	50	94	-
Bilous et al. 2006 [187]	43	88	-
Cayre et al. 2007 [163]	55	92	0,76-0,88
Dandachi et al. 2002 [188]	38	100	-
Di Palma et al. 2007 [189]	161	100	0,91
Gong et al. 2009	226	99	-
Gong et al., 2005 [125]	80	91	0,93-1,0
Gupta et al. 2003 [190]	31	84	-
Hanna und Kwok 2006 [179]	254	95	0,91
Hauser- Kronberger und Dandachi 2004 [191]	173	100	-
Hyun et al. 2008 [192]	309	97	-
Isola et al. 2004 [193]	192	94	0,88
Laakso et al., 2006 [194]	44	91	0,82
Lin et al. 2005 [195]	25	92	-
Li-Ning -T et al. 2005 [196]	32	97	-
Loring et al. 2005 [197]	119	99	-
Mollerup et al. 2012 [198]	365	98	0,92
Park et al. 2003 [199]	188	94	0,84
Pederson & Rasmussen [200]	72	99	0,97

Pothos et al. 2008 [201]	88	100	-
Riethdorf et al. 2011 [202]	399	95	0,83
Saez et al. 2006 [203]	200	95	0,86
Tanner et al. 2000 [204]	157	94	-
van de Vijver et al. 2003	208	90	-
van de Vijver et al. 2007 [205]	211	92	-
Vera-Roman und Rubio-Martinez 2004 [206]	50	94	-
Vocaturo et al. 2006 [207]	111	95	-
Wixom et al. 2004 [208]	31	97	-
Zhao et al. 2002 [209]	62	100	-

- = nicht angegeben

Die CISH zeigt dabei aufgrund der deutlichen Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FISH ihre gleichwertige Stellung. Auch im Rahmen unserer Untersuchung ließ sich bei Gegenüberstellung der CISH- mit den FISH-Ergebnissen der Stanzten die entsprechende Zuverlässigkeit der HER2-Bestimmung mit der CISH mit einem κ von 0,90 und einer Konkordanz von 98 % beweisen. Dabei fiel κ mit 0,92 bei ebenfalls 98 % Übereinstimmung der Fälle bei Gegenüberstellung der CISH- mit den FISH-Ergebnissen der Resektatgruppe noch leicht höher aus. Dieses Resultat ließ sich gut in die Ergebnisse der Tabelle 4-1 einordnen und unterstützt die These, dass die CISH der FISH durchaus gleichwertig ist. Bereits im Jahr 2008 wurde die Methode der Dual-CISH zum Nachweis von HER2 und der Zentromerregion von Chromosom 17 auch infolge klarer Forderung der Fachwelt [179, 189] durch die FDA zugelassen [210]. Das Prinzip wurde bis hin zur Automatisierung der Methode als auch zur Entwicklung der SISH weiterentwickelt [142, 211]

CISH-Ergebnisse wurden bereits mehrfach, zumeist aber retrospektiv mit dem Therapieansprechen der Patienten korreliert, manche Autoren sehen sie dabei auch als prognostischen Faktor [62, 212-214].

Durch das Aufkommen der Dual-CISH ist die CISH mindestens gleichberechtigt, wenn nicht zu bevorzugen. Wobei man hier den begrenzten Einsatz einer Chromosom 17 Sonde bei den grenzwertigen Fällen, beispielsweise bei 4-6 Kernsignalen diskutieren kann [215]. Viele Autoren hingegen sehen die meisten Polysomie-Fälle im Bereich von 3-5 Signalen beim CISH, so dass eine Grenze ab 6 Signalen der Integration dieser Fälle ins Positivkollektiv vorbeugt. Es besteht aber dennoch ein Restrisiko, falsch positive Fälle zu rekrutieren [123, 136, 216].

Innerhalb der diskordanten Fälle bei Vergleich der Methoden fällt häufig eine grenzwertige HER2/Chr.17 Ratio von 1,8 bis 2,2 auf. Neue Studien müssen laut Arnould et al. (2003) darlegen, ab welchem Niveau der Amplifikation eine HER2 gerichtete Therapie wirkt, sowie bei welchen Kombinationen [122]. Außerdem gibt

es neue Erkenntnisse, welche die Benutzung von nur einer Sonde für das Zentromer von Chromosom 17 zum Beweis einer Polysomie von Chromosom 17 anzweifeln, da auch im Bereich des Zentromers Amplifikationen von Genen vorkommen. Hier konnte anhand von 20 äquivokalen Fällen in drei Fällen ein falsches Ergebnis der Dual-FISH gezeigt werden [217].

4.2.7 HercepTest™, CISH und FISH

Fraglich bleibt, wie mit den eindeutig überexprimierten, nicht amplifizierten Fällen hinsichtlich einer möglichen Therapie verfahren werden soll. Dieser Prozentsatz belief sich von 20 % (FISH, Stanze) über 24 % (beide, Resektat) bis zu 28,6 % (CISH, Stanze). Gown et al. (2008) haben einen Anteil von 30 % gefunden, Vera-Roman & Rubio-Martinez (2004) beschrieben sogar einen Anteil bis 50 % [5, 123]. Auch der Anteil von amplifizierten Fällen, die sich im Bereich des HercepTest™ 0 und 1+ befinden, muss diskutiert werden. Unsere Ergebnisse zeigten durchschnittlich einen Anteil von 1,2 %. Kann eine zielgerichtete Therapie denn greifen ohne Präsentation des Zieles durch die Zelle?

Einige retrospektive Studien fanden dieselbe Prognose für FISH pos./IHC neg. Fälle wie für FISHpos./IHCpos. [216, 218]. Wohin gegen FISH neg./IHC pos. eher den FISH neg./IHC neg. Fällen entsprachen. Auch Seidman et al. (2001) gehen davon aus, dass die FISH neg./IHC pos. (HercepTest™ 3+) Fälle ein schlechteres Ansprechen als die FISH pos. Fälle haben, auch wenn sie nur das Gesamtansprechen auf Taxol/Herceptin betrachten [47]. Hofmann et al. (2008) zeigten hingegen bei 19 metastasierten Mammakarzinom-Patienten, die ein partielles oder vollständiges Ansprechen auf *first line* Trastuzumab mono aufwiesen, eine höhere Sensitivität für den HercepTest™ 3+ als für die positive FISH [219].

Eine Polysomie des Chromosoms 17 wird bei den ISH-Methoden, welche dafür eine Zentromersonde zusätzlich hybridisieren, detektiert. Schätzungsweise bis zu einem Drittel der Mammakarzinome sind aneuploid. Bei einer Polysomie des Chromosoms 17 gehen die meisten Autoren von einer Vermehrung des HER2-Gens ohne Effekt im Sinne einer Überexpression für die Zelle aus. Manche Autoren gehen von keinem Therapieansprechen für diese Fälle aus [220-222]. Vanden Bempt et al. (2008) konnten bei 104 Fällen (in 46% ihrer Patientenkohorte) mit einer Polysomie von Chromosom 17 keinen Fall mit einer IHC 3+ nachweisen [222] Dagegen konnten sie viele schwach positiv exprimierte Fälle (IHC 2+, äquivok) in dieser Gruppe aufzeigen. Dem stehen die Ergebnisse anderer Autoren gegenüber, die sogar Anteile von 47-86 % polysomer Fälle innerhalb der IHC pos./FISH neg. Gruppe beschrieben [223-225]. Hofmann et al. (2008) zeigten darüber hinaus in der Gruppe

der IHC pos. (3+)/FISH neg. Fälle zwei Fälle einer Polysomie von Chromosom 17, welche neben noch einem nicht polysomen Fall von insgesamt 9 IHC pos./FISH neg. Fällen (7 % der IHC 3+ Fälle) auf Trastuzumab Monotherapie angesprochen hatten [219]. Auch Kaufmann et al. (2007) fanden einen therapeutischen Nutzen von Trastuzumab in einer Kombination mit Paclitaxel bei einer Subgruppe Chr. 17 polysomer Patienten ohne HER2-Positivität (12 von 19 Patienten zeigten ein Ansprechen). Die Ansprechrate war dabei signifikant größer als beim alleinigen Einsatz von Paclitaxel [226]. Sogar in einer Subgruppe der NSABP-B 31 Studie von 174 Patienten, die bereits eingeschlossen waren, aber im Rahmen der zentralen Retestung nicht mehr IHC 3+ und/oder FISH positiv waren, konnte ein signifikanter Effekt durch die adjuvante Hinzunahme von Trastuzumab nachgewiesen werden [227]. Darüber hinaus können Tumoren HER2 auch ohne Amplifikation des dazugehörigen Gens überexprimieren. Dies kann aus einer vorübergehend gesteigerten Transkription [42, 44] oder aus einem verminderten Abbau der m-RNA resultieren [42, 59, 228]. Diese Ergebnisse widersprechen einer Bewertung der ISH als Goldstandard der HER2-Bestimmung.

Mittels zusätzlicher Analyse der IHC 2+ Fälle mit der ISH fanden wir den selben Anteil (22/222) HER2 positiv bestätigter Fälle unter den IHC 2+/3+ Fällen im Stanzbiopsie- und Resektatkollektiv. Dies spricht für die Zuverlässigkeit der Stanzbiopsie bei der IHC. Es zeigten 19-24 % der IHC 3+ Fälle mit der ISH keine Amplifikation. Deshalb ist zu fordern, dass bei Gegenüberstellung der HercepTest™-Ergebnisse mit den ISH-Ergebnissen mindestens die 2+ und 3+ Fälle anhand des Resektates zu überprüfen sind. Letztlich ist aber auch durch die generelle Gegenüberstellung mit dem Präparat-Ergebnis ein Erkenntniszugewinn zu erwarten. Gerade weil sich bei den diskordanten Fällen vielfach grenzwertige HER2/CEP17-Ratios nachweisen lassen, vermuten wir auch aufgrund der vorbeschriebenen mikroskopischen Erfahrung heterogene Tumoren besonders im diesem Bereich der Fälle mit grenzwertigen Befunden. Je mehr Ergebnisse, desto sicherer ist der Konsens zur Definition des HER2-Status. Bei diskordanten Ergebnissen bleibt der Abgleich mit dem Therapieansprechen zentrales Instrument der Validierung.

4.2.8 HER2 negative Sonderfälle

Es gibt Übersichten, welche Tumoren keine, beziehungsweise äußerst selten eine HER2-Positivität zeigen sollen. So wird erwogen, G1, lobuläre als auch stark ER/PgR positive Tumoren nicht bezüglich einer HER2-Amplifikation zu untersuchen [229]. Dabei besteht das Risiko aufgrund einer fehlerhaften Diagnose einen

Folgefehler einzugehen. Die 2011 AGO Mamma Leitlinie empfiehlt beispielsweise IHC 3+ Ergebnisse in einer G1 oder G2 Stanzbiopsie mittels einer FISH oder einer erneuten IHC an dem Resektat zu überprüfen [136]. 2012 wurde dann die generelle Überprüfung von 3+ Stanzbiopsie-Befunden erwogen [230]. Innerhalb der in Stanze und Resektat definitiv bestätigten G1 Tumore (n=36 Fälle) fand sich nur ein mehrfach HER2 amplifizierter Fall. Zusätzlich war dieser Fall Hormonrezeptor positiv (ER pos. IRS 12/PgR pos. IRS6).

Unter den 24 lobulären Karzinomen unseres Kollektives war ein Fall nachweisbar, der in beiden Gewebeproben im HercepTest™ 3+, in der ISH komplett negativ und bezüglich der ER/PgR positiv war. Ein weiterer wies nur mit der ISH des Resektates eine HER2-Amplifikation auf.

Innerhalb der 15 Fälle, die im Resektat ER IRS 12/PgR IRS 12 waren, also hoch Hormonrezeptor-positiv, gab es keinen Nachweis einer HER2 Amplifikation, jedoch zwei Fälle die mittels HercepTest™ 3+ im Resektat, aber nur 1+ in der Stanze zeigten. Dies lässt den Verdacht auf eine falsch positive Anfärbung des Resektates aufkommen. Betrachtet man die 24 Fälle, die in der Stanze ER IRS 12/PgR IRS 12 waren, gab es bezüglich HER2 nur einen grenzwertig amplifizierten Fall 1+/2+ pn(1,95)pp (2,53) ohne definitive Überexpression, sowie einen Fall, welcher lediglich eine Überexpression in der Stanze mit IHC 3+ aufwies. Dieser zeigte im Resektat gar keine Anfärbung beim HercepTest™. Auch hier gab es zwei Fälle, welche im Resektat einen HercepTest™ von 3+ gegenüber 1+ in der Stanze aufwiesen. Andererseits sind die Fallzahlen dieser Subgruppen zu gering, um daraus generelle Schlüsse abzuleiten. Demgegenüber gibt es Studien, die auch bei niedrigem Grading, lobulären Karzinomen, sowie stark Hormonrezeptor positiven Karzinomen eine HER2 Positivität nachwiesen [187, 199].

4.2.9 Ausblick

Generell muss das Ansprechen HER2 positiver Tumoren auch hinsichtlich der neuen Therapieansätze mit Lapatinib, Pertuzumab und T-DM1 überprüft werden [114, 231]. Erstrebenswert sind zusätzliche Erkenntnisse im Rahmen neuer Studien, warum nicht alle HER2 positiven Patienten auf die Therapie reagieren und weshalb auch HER2 negative Patienten profitieren können. Aktuelle Studien laufen natürlich leider nur mit den Einschlusskriterien IHC 3+ und/oder FISH positiv. Dabei wird es unmöglich, zum Beispiel die Chromosom-17-polysomen HER2 negativen Patienten bezüglich des Therapie-Ansprechens zu überprüfen. Press et al. haben zwei Studien retrospektiv bezüglich ihres HER2-Status mit IHC und FISH bei jeweiligem

Therapieansprechen auf Lapatinib überprüft. Dabei fiel auf, dass nur die FISH positiven Fälle (darunter auch IHC 0 und 1+) auf Lapatinib ansprechen [232].

Die Kombination von bestimmten „*targeted*“, also zielgerichteten Therapien stellt einen neuen und vielversprechenden Weg dar. So zeigte ja bereits Lapatinib zusammen mit Trastuzumab ein besseres Ansprechen als bei alleinigem Einsatz [233-235]. Auch die Hinzunahme von Pertuzumab bei Progression unter Herceptin bei metastasiertem Mammakarzinom zeigte ein Ansprechen [114, 236]. Die neoadjuvante NeoSphere Studie konnte sogar eine komplette Remission in 45,8 % auf die Kombination aus Docetaxel, Trastuzumab und Pertuzumab nachweisen [237]. Wie auch die neoadjuvante NeoALTTO-Studie eine Rate der Komplettremission von sogar 54,3 % bei Kombination von Paclitaxel, Trastuzumab und Lapatinib zeigen konnte [235]. Daraufhin wird die generell neoadjuvante Therapie des HER2 positiven Mammakarzinoms diskutiert, was die absolute Notwendigkeit der Zuverlässigkeit der Diagnose aus der Stanzbiopsie aufzeigt [237]. Hier werden laufende Studien, die zielgerichtete Substanzen miteinander kombinieren noch weitere Möglichkeiten nachweisen [238, 239]. Der Einsatz von Kombinationstherapien könnte außerdem das Auftreten von Therapieresistenzen vermindern.

In der Erforschung der Resistenzmechanismen hat man Ursachen, wie die sterische Veränderung des HER2-Rezeptors [88, 103, 104], die Initiierung alternativer Signalwege [105, 106] und die Veränderung des zu hemmenden Signalweges aufgrund veränderter Expression bestimmter Effektoren gefunden [101, 107, 108, 110]. Bei Mammakarzinomen mit hoher HER2-Amplifikation (HER2/Chr.17 ratio 15-22) wurde dabei ein erhöhtes Resistenzrisiko bezüglich Trastuzumab gezeigt [111, 112]. Dabei ist nicht genau geklärt wie diese Resistenzen entstehen und wie sie zu überwinden sind.

Auch der prospektiv gewonnene Verlauf des HER2-Status unter und nach den jeweiligen Therapien könnte dabei neue Erkenntnisse bringen. Der wichtigste Aspekt bei der Definition der zuverlässigsten HER2-Bestimmung ist dabei die Erforschung der Korrelation der HER2-Bestimmungsmethoden mit ihren Ergebnissen und dem jeweiligen Therapieansprechen. Wobei aber die Resistenzmechanismen eine direkte Abhängigkeit des Therapieansprechens vom HER2-Status relativieren. Die Zukunft liegt möglicherweise in der ausführlichen Charakterisierung der Tumoren auf DNA-Ebene und/oder auf mRNA Niveau wie mit neu vorgestellten Methoden der RISH, der Stellaris™ fluorescence *in situ* hybridization und QuantiGene® ViewRNA ISH tissue assay [240-242].

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde bei 185 Patienten der HER2-Status in der Stanzbiopsie und dem zugehörigen Resektat des Mammakarzinoms mit den zwei Methoden CISH und FISH bestimmt. Anhand der zusätzlichen großenteils aus der Routinediagnostik übernommenen Ergebnisse der immunhistochemischen Diagnostik (HercepTest™) konnten alle drei Bestimmungsmethoden zweiseitig miteinander korreliert werden. Außerdem wurden die ebenfalls aus der Routinediagnostik übernommenen Hormonrezeptorbefunde aller Fälle analysiert. Dabei wurden die Ergebnisse aus dem Stanzgewebe auch hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft und Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Resektate verglichen. Es zeigte sich eine größere Prävalenz der HER2 positiven Fälle im Kollektiv der Resektate. Dies wurde auf die mögliche Tumorerheterogenität, die in dem zumeist größeren Tumorauschnitt im Resektat mit größerer Wahrscheinlichkeit zum Nachweis kommt, zurückgeführt. Bei zusätzlicher Untersuchung der IHC 2+ Fälle mittels ISH zeigte sich dabei die Stanze gegenüber dem Resektat bei der HER2-Bestimmung mit der IHC gleichberechtigt. CISH und FISH korrelierten innerhalb der Gewebekohorten sehr gut miteinander. Außerdem zeigte die CISH in unserem Kollektiv die größte Konkordanz zwischen den Ergebnissen der Stanzbiopsie und des Resektates (kappa 0,84). Die CISH wurde 2008 durch die FDA zugelassen und ist damit der FISH mindestens gleichwertig bei zusätzlich methodischen und finanziellen Vorteilen. Aufgrund der nur mäßigen Konkordanz der Stanze mit dem Resektat im Rahmen der immunhistochemischen HER2-Bestimmung und eines relevanten Anteils ISH negativer IHC 3+ Fälle empfehlen wir die Durchführung einer ISH bei IHC 2+ und 3+ am Stanzbiopsiematerial. Bei bleibend diskrepanten Fällen muss eine weiterführende Diagnostik, sowie eine Einzelfall-Diskussion zwischen Kliniker und Pathologen und eine Aufklärung des Patienten bezüglich der Entscheidung über eine HER2 gerichtete Therapie erfolgen.

Die Ergebnisse der Östrogenrezeptoren anhand der Stanzbiopsie zeigten sich in unseren Ergebnissen als repräsentativ. Dabei kann anhand des Resektates die Kontrolle mittels Bestimmung der Progesteronrezeptoren erfolgen. In unserer Kohorte wären bei diesem Algorithmus alle mutmaßlich Hormonrezeptor-positiven Fälle detektiert wurden. Bei kleiner Fallzahl und retrospektivem Ansatz ist dies prospektiv zu überprüfen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten (2012). Brustkrebs (Mammakarzinom) ICD-10 C50, RKI http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (28.07.2012).
- 2 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008). Atlas der Krebsinzidenz und Krebsmortalität der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. „Der GEKID Atlas“, Ergebnisse der Hochrechnungen für Deutschland (Datenstand Mitte 2010), Zusammenfassung. <http://www.gekid.de/> (28.07.2012).
- 3 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008 Häufigkeiten und Trends, 8. Ausgabe. http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.pdf?__blob=publicationFile (28.07.2012).
- 4 Hodi Z, Chakrabarti J, Lee AH, Ronan JE, Elston CW, Cheung KL, Robertson JF, Ellis IO (2007) The reliability of assessment of oestrogen receptor expression on needle core biopsy specimens of invasive carcinomas of the breast. *J Clin Pathol* 60: 299-302.
- 5 Gown AM, Goldstein LC, Barry TS, Kussick SJ, Kandalaft PL, Kim PM, Tse CC (2008) High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system. *Mod Pathol* 21: 1271-1277.
- 6 van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ et al (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999-2009.
- 7 van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, Friend SH (2003) Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res* 5: 57-58.
- 8 van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536.
- 9 Loibl S, Rody A (2012). Prognostische und prädiktive Faktoren, Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome, in AGO e.V., Kommission Mamma; 2011, Guidelines Breast. Version 2012. http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2012/06_2012D_Prognostische_und_praediktive_Faktoren.pdf Aktualisierung 23.03.2012 (08.08.2012).
- 10 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.
- 11 Henry NL, Hayes DF (2006) Uses and Abuses of Tumor Markers in the Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Primary and Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist* 11: 541-552.
- 12 Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA (1981) Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290: 261-264.
- 13 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-Mr tumour antigen. *Nature* 312: 513-516.
- 14 King CR, Kraus MH, Aaronson SA (1985) Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229: 974-976.
- 15 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.
- 16 Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L (1985) The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229: 976-978.

- 17 Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307: 521-527.
- 18 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.
- 19 Rubin I, Yarden Y (2001) The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 1: 3-8.
- 20 Alroy I, Yarden Y (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410: 83-86.
- 21 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 U S A* 96: 4995-5000.
- 22 Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8132-8136.
- 23 Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16: 1647-1655.
- 24 Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11: 495-505.
- 25 Yarden Y (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: 3-8.
- 26 Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137.
- 27 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.
- 28 Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284: 54-65.
- 29 Lohrisch C, Piccart M (2001) An overview of HER2. *Semin Oncol* 28: 3-11.
- 30 Park JW, Neve RM, Szollosi J, Benz CC (2008) Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer* 8: 392-401.
- 31 Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ (2000) The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 103: 57-75.
- 32 Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-184.
- 33 Baselga J (2006) Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 312: 1175-1178.
- 34 De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S, Ruggiero A, Marinelli A, Pagliarulo C, Panico L, Pettinato G, Petrella G, Bianco AR (2003) Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1039-1046.
- 35 Perrone G, Santini D, Vincenzi B, Zagami M, La Cesa A, Bianchi A, Altomare V, Primavera A, Battista C, Vetrani A, Tonini G, Rabitti C (2005) COX-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features. *Histopathology* 46: 561-568.

- 36 Roses RE, Paulson EC, Sharma A, Schueller JE, Nisenbaum H, Weinstein S, Fox KR, Zhang PJ, Czerniecki BJ (2009) HER-2/neu Overexpression as a Predictor for the Transition from In situ to Invasive Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 18: 1386-1389.
- 37 Layfield LJ, Lewis C (2007) In situ and invasive components of mammary adenocarcinoma: comparison of Her-2/neu status. *Anal Quant Cytol Histol* 29: 239-243.
- 38 Hoque A, Sneige N, Sahin AA, Menter DG, Bacus JW, Hortobagyi GN, Lippman SM (2002) HER-2/neu Gene Amplification in Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 11: 587-590.
- 39 Vidgren V, Varis A, Kokkola A, Monni O, Puolakkainen P, Nordling S, Forozan F, Kallioniemi A, Vakkari ML, Kivilaakso E, Knuutila S (1999) Concomitant gastrin and ERBB2 gene amplifications at 17q12-q21 in the intestinal type of gastric cancer. *Genes Chromosom Cancer* 24: 24-29.
- 40 Slamon D, Pegram M (2001) Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol* 28: 13-19.
- 41 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.
- 42 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.
- 43 Torrisi R, Rotmensz N, Bagnardi V, Viale G, Curto BD, Dell'orto P, Veronesi P, Luini A, D'Alessandro C, Cardillo A, Goldhirsch A, Colleoni M (2007) HER2 status in early breast cancer: relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17. *Eur J Cancer* 43: 2339-2344.
- 44 Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW (2000) Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 13: 37-45.
- 45 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 118-145.
- 46 Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Enge J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzel D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, von Minckwitz G, Naß-Griegoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreier I, Schulte H, Schulz KD, Souchon C, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J, Zemmler T (2008) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München. 1. Aktualisierung: 51-53.
- 47 Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, Panageas KS, Arroyo C, Valero V, Currie V et al (2001) Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19: 2587-2595.
- 48 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.
- 49 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.
- 50 Hicks DG, Kulkarni S (2008) HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol* 129: 263-273.

- 51 Seshadri R, Fircgair FA, Horsfall DJ, 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.
- 52 Yeon CH, Pegram MD (2005) Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 23: 391-409.
- 53 Menard S, Balsari A, Tagliabue E, Camerini T, Casalini P, Bufalino R, Castiglioni F, Carcangiu ML, Gloghini A, Scalone S, Querzoli P, Lunardi M, Molino A, Mandara M, Mottolese M, Marandino F, Venturini M, Bighin C, Cancellato G, Montagna E, Perrone F, De Matteis A, Sapino A, Donadio M, Battelli N, Santinelli A, Pavesi L, Lanza A, Zito FA, Labriola A, Aiello RA, Caruso M, Zanconati F, Mustacchi G, Barbareschi M, Frisinghelli M, Russo R, Carrillo G (2008) Biology, prognosis and response to therapy of breast carcinomas according to HER2 score. *Ann Oncol* 19: 1706-1712.
- 54 Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ (2005) Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 11: 6598-6607.
- 55 Ross JS, Fletcher JA (1998) The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3: 237-252.
- 56 Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34: 791-808.
- 57 Burstein HJ (2005) The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 353: 1652-1654.
- 58 Hayes DF, Trock B, Harris AL (1998) Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 52: 305-319.
- 59 Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5321-5325.
- 60 McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM, Carney DN (1991) Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 51: 3296-3303.
- 61 Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, Della Porta G, Menard S, Pierotti MA, Testori A (1991) Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 49: 44-49.
- 62 Todorovic-Rakovic N, Jovanovic D, Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D (2007) Prognostic value of HER2 gene amplification detected by chromogenic in situ hybridization (CISH) in metastatic breast cancer. *Ex Mol Pathol* 82: 262-268.
- 63 Noske A, Loibl S, Darb-Esfahani S, Roller M, Kronenwett R, Muller BM, Steffen J, von Toerne C, Wirtz R, Baumann I, Hoffmann G, Heinrich G, Grasshoff ST, Ulmer HU, Denkert C, von Minckwitz G (2010) Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). *Breast Cancer Res Treat* 126: 109-117.
- 64 Farzadnia M, Meibodi NT, Shandiz FH, Mahmoudi M, Bahar MM, Memar B, Amoian S, Maroozi F, Moheghi N (2010) Evaluation of HER2/neu oncoprotein in serum and tissue samples of women with breast cancer: correlation with clinicopathological parameters. *Breast* 19: 489-492.
- 65 Shmueli E, Wigler N, Inbar M (2004) Central nervous system progression among patients with metastatic breast cancer responding to trastuzumab treatment. *Eur J Cancer (Oxford, England : 1990)* 40: 379-382.
- 66 Clayton AJ, Danson S, Jolly S, Ryder WDJ, Burt PA, Stewart AL, Wilkinson PM, Welch RS, Magee B, Wilson G, Howell A, Wardley AM (2004) Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 91: 639-643.

- 67 Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, Harris L, Younger J, Kuter I, Bunnell C, Rue M, Gelman R, Winer E (2003) Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer* 97: 2972-2977.
- 68 Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS (2000) Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol* 13: 542-547.
- 69 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-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14: 2702-2708.
- 70 Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ (2003) Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 142-153.
- 71 Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M (2006) Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 17: 818-826.
- 72 Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S, Proia AD, Murray J, Renshaw L, Faratian D, Thomas J, Dowsett M, Krause A, Evans DB, Miller WR, Dixon JM (2006) Estrogen-independent proliferation is present in Estrogen-Receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant Letrozole. *J Clin Oncol* 24: 3019-3025.
- 73 Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R (2004) Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu Cross-Talk in ER/HER2 Positive Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 926-935.
- 74 Hamilton A, Piccart M (2000) The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2. *Ann Oncol* 11: 647-663.
- 75 Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M (2005) Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* 23: 2469-2476.
- 76 Cittelly DM, Das PM, Salvo VA, Fonseca JP, Burow ME, Jones FE (2010) Oncogenic HER2 Δ 16 suppresses miR-15a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. *Carcinogenesis* 31: 2049-2057.
- 77 Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M (2001) Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3808-3816.
- 78 Koeberle D, Thuerlimann B (2007) Letrozole as upfront endocrine therapy for postmenopausal women with hormone-sensitive breast cancer: BIG 1-98. *Breast Cancer Research and Treatment* 105: 55-66.
- 79 Rasmussen BB RM, Lykkesfeldt AE, Dell'Orto P, Del Curto B, Henriksen KL, Mastropasqua MG, Thürlimann B, Viale G for the BIG 1-98 Collaborative Group, the IBCSG (2007) Central assessment of ER, PgR and HER2 in BIG 1-98 evaluating letrozole (L) vs. tamoxifen (T) as initial adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 25 (18S): 12S. Abstract 538.
- 80 Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, Cuzick J, Houghton J, Williams N, Mallon E, Bishop H, Ellis I, Larsimont D, Sasano H, Carder P, Cussac AL, Knox F, Speirs V, Forbes J, Buzdar A (2008) Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *J Clin Oncol* 26: 1059-1065.

- 81 Shak S (1999) Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 26: 71-77.
- 82 Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6: 443-446.
- 83 Iannello A, Ahmad A (2005) Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 24: 487-499.
- 84 Tokunaga E, Oki E, Nishida K, Koga T, Egashira A, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y (2006) Trastuzumab and breast cancer: developments and current status. *Int J Clin Oncol* 11: 199-208.
- 85 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.
- 86 Widakowich C, de Azambuja E, Gil T, Cardoso F, Dinh P, Awada A, Piccart-Gebhart M (2007) Molecular targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1375-1387.
- 87 Dean-Colomb W, Esteva FJ (2008) Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* 44: 2806-2812.
- 88 Molina MA, Saez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, Rojo F, Evans AJ, Albanell J, Keenan EJ, Lluch A, Garcia-Conde J, Baselga J, Clinton GM (2002) NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 347-353.
- 89 Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman 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.
- 90 Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Grotzer V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1659-1672.
- 91 Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas E P, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673-1684.
- 92 Schneeweiß A, Untch M (2012) Neoadjuvante systemische Therapie, Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinom, Guidelines Breast. AGO e.V., Kommission Mamma.
http://www.agoonline.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/maerz2012/12_2012D_Neoadjuvante_%28Primaere%29_systemische_Therapie.pdf (08.08.2012).
- 93 Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Barni S (2011) Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anticancer Drugs* 22: 128-135.
- 94 Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jaaskelainen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J (2006) Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 354: 809-820.
- 95 Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 719-726.

- 96 Ocana A, Cruz JJ, Pandiella A (2006) Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *Am J Clin Oncol* 29: 90-95.
- 97 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.
- 98 Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE, Jr., Ewer M, Keefe D, Shannon RP, Swain SM, Brown A, Fehrenbacher L, Vogel VG, Seay TE, Rastogi P, Mamounas EP, Wolmark N, Bryant J (2005) Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 23: 7811-7819.
- 99 Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Esteva FJ (2006) Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist* 11: 857-867.
- 100 Pugatsch T, Abedat S, Lotan C, Beerli R (2006) Anti-erbB2 treatment induces cardiotoxicity by interfering with cell survival pathways. *Breast Cancer Res* 8: R35.
- 101 Nielsen DL, Andersson M, Kamby C (2009) HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 35: 121-136.
- 102 Magne N, Chargari C, MacDermid D, Conforti R, Vedrine L, Spano JP, Khayat D (2010) Tomorrow's targeted therapies in breast cancer patients: what is the risk for increased radiation-induced cardiac toxicity? *Crit Rev Oncol Hematol* 76: 186-195.
- 103 Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM (2005) Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65: 473-482.
- 104 Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L, Carraway KL (2002) Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 99: 783-791.
- 105 Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001) Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93: 1852-1857.
- 106 Lu Y, Zi X, Zhao Y, Pollak M (2004) Overexpression of ErbB2 receptor inhibits IGF-I-induced Shc-MAPK signaling pathway in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 709-715.
- 107 Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D (2004) PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6: 117-127.
- 108 Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ (2004) P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 64: 3981-3986.
- 109 Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA (2002) Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 1: 707-717.
- 110 Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62: 4132-4141.
- 111 Bates M, Sperinde J, Kostler WJ, Ali SM, Leitzel K, Fuchs EM, Paquet A, Lie Y, Sherwood T, Horvat R, Singer CF, Winslow J, Weidler JM, Huang W, Lipton A (2011) Identification of a subpopulation of metastatic breast cancer patients with very high HER2 expression levels and possible resistance to trastuzumab. *Ann Oncol* 22: 2014-2020.
- 112 Joensuu H, Sperinde J, Leinonen M, Huang W, Weidler J, Bono P, Kataja V, Kokko R, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Isola J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Paquet A, Lie Y, Bates M (2011) Very high quantitative tumor HER2 content and outcome in early breast cancer. *Ann Oncol* 22: 2007-2013.

- 113 Peoples GE, Holmes JP, Hueman MT, Mittendorf EA, Amin A, Khoo S, Dehqanzada ZA, Gurney JM, Woll MM, Ryan GB, Storer CE, Craig D, Ioannides CG, Ponniah S (2008) Combined Clinical Trial Results of a HER2/neu (E75) Vaccine for the Prevention of Recurrence in High-Risk Breast Cancer Patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Clin Cancer Res* 14: 797-803.
- 114 Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortés J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L (2010) Phase II Trial of Pertuzumab and Trastuzumab in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Positive Metastatic Breast Cancer That Progressed During Prior Trastuzumab Therapy. *J Clin Oncol* 28: 1138-1144.
- 115 Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blättler WA, Lambert JM, Chari RVJ, Lutz RJ, Wong Wai LT, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX (2008) Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res* 68: 9280-9290.
- 116 UICC (Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C) (2009) *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6. Aufl. Wiley-Blackwell, New York, Oxford.
- 117 Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF et al (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 3628-3636.
- 118 Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410.
- 119 Remmele W, Stegner H (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* 8: 138-140.
- 120 Dako Denmark (2011) HercepTest™ Code K5204, 16th edition. <http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=120856004> (28.07.2012).
- 121 Madrid MA, Lo RW (2004) Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 6: 593-600.
- 122 Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO, Couturier J (2003) Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 88: 1587-1591.
- 123 Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA (2004) Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 128: 627-633.
- 124 Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Osamura RY, Ruschoff J, van de Vijver M (2009) Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol* 132: 539-548.
- 125 Gong Y, Gilcrease M, Sneige N (2005) Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol* 18: 1015-1021.
- 126 Greve W, Wentura D (1997) *Wissenschaftliche Beobachtung: Eine Einführung*. PVU/Beltz, Weinheim: 111.
- 127 Landis J, Koch G (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- 128 Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, Pusztai L, Green MC, Arun BK, Giordano SH et al (2005) Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with Trastuzumab, Paclitaxel, and Epirubicin chemotherapy: Results of a randomized trial in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 3676-3685.

- 129 Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, Bauerfeind I, Hilfrich J, Eidtmann H, Gerber B, Hanusch C, Kühn T, du Bois A, Blohmer J-U, Thomssen C, Dan Costa S, Jackisch C, Kaufmann M, Mehta K, von Minckwitz G (2010) Neoadjuvant Treatment With Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer: Results From the GeparQuattro Study. *J Clin Oncol* 28: 2024-2031.
- 130 Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, Vazquez F, Byakhov M, Lichinitser M, Climent MA, Ciruelos E, Ojeda B, Mansutti M, Bozhok A, Baronio R, Feyereislova A, Barton C, Valagussa P, Baselga J (2010) Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet* 375: 377-384.
- 131 Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, Aura C, De Azambuja E, Gomez H, Dinh P, Fauria K, Van Dooren V, Paoletti P, Goldhirsch A, Chang T-W, Lang I, Untch M, Gelber RD, Piccart-Gebhart M on Behalf of the NeoALTTO Study Team (2010) First results of the NeoALTTO trial (BIG 01-06/EGF 106903); a phase III, randomized, open label, neoadjuvant study of lapatinib, trastuzumab, and their combination plus paclitaxel in women with HER2-positive primary breast cancer (abstract S3-3). *Cancer Res* 70 (Suppl.24): 82.
- 132 Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A, Generali DG, Cagossi K, Artioli F, Bisagni G, Boni C, Ravaioli A, Amadori D, Musolino A, Cavanna M, Untch M, Orlando L, Giardina G, Piacentini F, Tagliafico E, Bagnalasta M, D'Amico R, Conte PF (2011) Final results of a phase II randomized trial of neoadjuvant anthracycline-taxane chemotherapy plus lapatinib, trastuzumab, or both in HER2-positive breast cancer (CHER-LOB trial) (abstract). *J of Clin Oncol* 29.
- 133 Untch M, Fasching PA, Konecny GE, Hasmüller S, Lebeau A, Kreienberg R, Camara O, Müller V, du Bois A, Kühn T, Stickeler E, Harbeck N, Höss C, Kahlert S, Beck T, Fett W, Mehta KM, von Minckwitz G, Loibl S (2011) Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy Plus Trastuzumab Predicts Favorable Survival in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Breast Cancer: Results From the TECHNO Trial of the AGO and GBG Study Groups. *J of Clin Oncol* 29: 3351-3357.
- 134 Dendukuri N, Khetani K, Mclsaac M, Brophy J (2007) Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ* 176: 1429-1434.
- 135 Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF (2009) Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27: 1323-1333.
- 136 Huober J, Sinn HP (2011) Pathologie, Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinom, Guidelines Breast. AGO e.V., Kommission Mamma http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/g_mamma_11_1_0_d_10_pathology.pdf (28.07.2012)
- 137 Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Dubsy P, Roka S, Bachleitner T, Kandioler D, Steger G, Mittlbock M, Jakesz R (2004) Prognostic markers in breast cancer: The reliability of HER2/neu status in core needle biopsy of 325 patients with primary breast cancer. *Wien Klin Wochenschr* 116: 26-31.
- 138 Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15: 2894-2904.
- 139 Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, Flynn PJ, Ingle JN, Visscher D, Jenkins RB (2006) HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 Intergroup Adjuvant Trial. *J Clin Oncol* 24: 3032-3038.

- 140 Mc Cullough AE, Dell'Orto P, Reinholz MM, Gelber RD, Dueck AC, Russo L, Jenkins RB, Andrighetto S, Chen B, Lingle WL et al (2010) Concordance of HER2 Central Assessment by Two International Central Laboratories: A Ring Study within the Framework of the Adjuvant HER2-Positive ALTTO Trial (BIG2-06/N063D/EGF106708). SABCS 2010 abstract poster.
http://www.abstracts2view.com/sabcs10/view.php?nu=SABCS10L_790&terms=
(28.07.2012).
- 141 Stordeur S, Vrijens F, Beirens K, Vlayen J, Devriese S, Van Eycken E (2010) Quality indicators in oncology: breast cancer. Good Clinical Practice (GCP). Brussels: Belgian Health Care Knowledge Centre (KCE)
https://kce.fgov.be/sites/default/files/page_documents/kce_150c_breast_cancer_1.pdf
(28.07.2012).
- 142 Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR (2009) Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. *Diagn Mol Pathol* 18: 88-95.
- 143 Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, Downs-Kelly E, Pettay J, Hartke MB, Hood L, Neelon R, Myles J, Budd GT, Moore HC, Andresen S, Crowe JP (2007) Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. *Diagn Mol Pathol* 16: 207-210.
- 144 National Breast Cancer Centre, Cancer Australia (2011) Recommendations for use of Trastuzumab (Herceptin®) for the treatment of HER2-positive breast cancer.
<http://guidelines.nbccc.org.au/guidelines/print/ch05.php#Ch1057Se228546> (28.07.2012).
- 145 van de Ven S, Smit VTHBM, Dekker TJA, Nortier JWR, Kroep JR (2011) Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 37: 422-430.
- 146 Cahill RA, Walsh D, Landers RJ, Watson RG (2006) Preoperative profiling of symptomatic breast cancer by diagnostic core biopsy. *Ann Surg Oncol* 13: 45-51.
- 147 Connor CS, Tawfik OW, Joyce AJ, Davis MK, Mayo MS, Jewell WR (2002) A comparison of prognostic tumor markers obtained on image-guided breast biopsies and final surgical specimens. *Am J Surg* 184: 322-324.
- 148 Sharifi S, Peterson MK, Baum JK, Raza S, Schnitt SJ (1999) Assessment of pathologic prognostic factors in breast core needle biopsies. *Mod Pathol* 12: 941-945.
- 149 Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Reinholz MM, Tenner KS, Davidson NE, Gralow J, Harris LN, Kutteh LA, Hillman DW, Jenkins RB, Chen B (2012) Predictability of Adjuvant Trastuzumab Benefit in N9831 Patients Using the ASCO/CAP HER2-Positivity Criteria. *Journal of the National Cancer Institute* 104: 159-162.
- 150 Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, Barr K, Deavers MT (2009) Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a Tertiary Care Facility Increases HER2 Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Concordance and Decreases the Number of Inconclusive Cases. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133: 775-780.
- 151 Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, Bersani S, Remo A, Reghellin D, Chilosi M, Bonetti F (2008) HER-2/neu assessment in breast cancer using the original FDA and new ASCO/CAP guideline recommendations. *Am J of Clin Pathol* 129: 907-911.
- 152 Shah SS, Ketterling RP, Goetz MP, Ingle JN, Reynolds CA, Perez EA, Chen B (2010) Impact of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on HER2 interpretation in breast cancer. *Hum Pathol* 41: 103-106.
- 153 Arnould L, Roger P, MacGrogan G, Chenard M-P, Balaton A, Beauclair S, Penault-Llorca F (2012) Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Mod Pathol* 25: 675-682.

- 154 MC Colough AE, Chen B, Hillman DW, Tenner KS, Jenkins RB, Reinholz MM, Lingle WL, Dueck AC, Perez EA (2010) 100% Concordance between IHC and FISH HER2 testing cannot be achieved using N9831 Cohort. *Mod Pathol* 23: 276 abstract.
- 155 Dietel M, Ellis IO, Hofler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kolble K, Kristiansen G (2007) Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 451: 19-25.
- 156 Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, Ma Y, Veys I, Di Leo A, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D (2006) Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 5: 2572-2579.
- 157 Vang Nielsen K, Jorgensen JT, Schonau A, Oster A (2007) Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 4020; author reply 4021-4023.
- 158 Lal P, Tan LK, Chen B (2005) Correlation of HER-2 status with Estrogen and Progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology* 123: 541-546.
- 159 Bhargava R, Lal P, Chen B (2005) Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am J Clin Pathol* 123: 237-243.
- 160 Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, Mass RD, Sanders C, Press MF (2005) Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 93: 3-11.
- 161 Lewis JT, Ketterling RP, Halling KC, Reynolds C, Jenkins RB, Visscher DW (2005) Analysis of intratumoral heterogeneity and amplification status in breast carcinomas with equivocal (2+) HER-2 immunostaining. *American Journal of Clinical Pathology* 124: 273-281.
- 162 Lebeau A, Turzynski A, Braun S, Behrhof W, Fleige B, Schmitt WD, Grob TJ, Burkhardt L, Holzel D, Jackisch C, Thomssen C, Müller V, Untch M (2010) Reliability of human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry in breast core needle biopsies. *J Clin Oncol* 28: 3264-3270.
- 163 Cayre A, Mishellany F, Lagarde N, Penault-Llorca F (2007) Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification. *Breast Cancer Res* 9: R64.
- 164 Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Tomasic G, van de Vijver M (2003) Current perspectives on HER2 testing: A review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol* 16: 173-182.
- 165 German Breast Group (2012) Unsere Studien. <http://www.germanbreastgroup.de/studien> (28.07.2012).
- 166 National Cancer Institute at the National Institutes of Health USA (2012) Trastuzumab in treating women with primary breast cancer. <http://cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=256320&version=healthprofessional> (28.07.2012).
- 167 Kantelhardt EJ (2009) Auswertung Tumordatenbank der Klinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Lokale Datenbank. Klinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- 168 Liebrich C, Unger G, Dlugosch B, Hofmann S, Petry KU (2011) Adopting guidelines into clinical practice: Implementation of Trastuzumab in the adjuvant treatment of breast cancer in Lower Saxony, Germany, in 2007. *Breast Care* 6: 43-50.
- 169 Choritz H, Büsche G, Kreipe H, On behalf of the Study Group HER2 Monitor (2011) Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch* 459: 283-289.

- 170 Mann GB, Fahey VD, Feleppa F, Buchanan MR (2005) Reliance on hormone receptor assays of surgical specimens may compromise outcome in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 5148-5154.
- 171 Raji A, Lurie RH (2007) Human epidermal growth factor receptor 2 testing recommendation. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1330-1331; author reply 1331-1333.
- 172 Rakha EA, Ellis IO (2007) An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin Pathol* 60: 1300-1306.
- 173 Brenner RJ, Fajardo L, Fisher PR, Dershaw DD, Evans WP, Bassett L, Feig S, Mendelson E, Jackson V, Margolin FR (1996) Percutaneous core biopsy of the breast: effect of operator experience and number of samples on diagnostic accuracy. *Am J Roentgenol* 166: 341-346.
- 174 Dronkers DJ (1992) Stereotaxic core biopsy of breast lesions. *Radiology* 183: 631-634.
- 175 Fishman JE, Milikowski C, Ramsinghani R, Velasquez MV, Aviram G (2003) US-guided core-needle biopsy of the breast: how many specimens are necessary? *Radiology* 226: 779-782.
- 176 Rich PM, Michell MJ, Humphreys S, Howes GP, Nunnerley HB (1999) Stereotactic 14G core biopsy of non-palpable breast cancer: what is the relationship between the number of core samples taken and the sensitivity for detection of malignancy? *Clin Radiol* 54: 384-389.
- 177 Melotti MK, Berg WA (2000) Core needle breast biopsy in patients undergoing anticoagulation therapy: preliminary results. *Am J Roentgenol* 174: 245-249.
- 178 Tamaki K, Sasano H, Ishida T, Miyashita M, Takeda M, Amari M, Tamaki N, Ohuchi N (2010) Comparison of core needle biopsy (CNB) and surgical specimens for accurate preoperative evaluation of ER, PgR and HER2 status of breast cancer patients. *Cancer Sci* 101: 2074-2079.
- 179 Hanna WM, Kwok K (2006) Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol* 19: 481-487.
- 180 Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR (2005) Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered. *Am J of Clin Pathol* 123: 21-27.
- 181 Li CI, Daling JR, Malone KE (2003) Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998. *J Clin Oncol* 21: 28-34.
- 182 Murray M, Liberman L, Nehhozina T, Akram M, Hassan M, Morrow M, Norton L, Brogi E (2009) Negative Estrogen Receptor and HER2 Assays at Core Biopsy of Invasive Cancers Should Be Confirmed in the Surgical Specimens. *Cancer Research* 69: Supplement 3, Abstract SABCS.
- 183 Striebel JM, Bhargava R, Horbinski C, Surti U, Dabbs DJ (2008) The equivocally amplified HER2 FISH result on breast core biopsy: indications for further sampling do affect patient management. *Am J Clin Pathol* 129: 383-390.
- 184 Kreipe HH, Ahrens P, Christgen M, Lehmann U, Länger F (2010) Jenseits von Staging, Typing und Grading. *Der Pathologe* 31: 54-59.
- 185 Elkin EB, Weinstein MC, Winer EP, Kuntz KM, Schnitt SJ, Weeks JC (2004) HER-2 testing and trastuzumab therapy for metastatic breast cancer: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Oncol* 22: 854-863.
- 186 Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B (2005) EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol* 18: 1027-1033.
- 187 Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G (2006) Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology* 38: 120-124.
- 188 Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C (2002) Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 82: 1007-1014.

- 189 Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, Layer G, Kissin MW, Cook MG (2007) Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 60: 1067-1068.
- 190 Gupta D, Middleton LP, Whitaker MJ, Abrams J (2003) Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 119: 381-387.
- 191 Hauser-Kronberger C, Dandachi N (2004) Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histol* 35: 647-653.
- 192 Hyun CL, Lee HE, Kim KS, Kim SW, Kim JH, Choe G, Park SY (2008) The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 61: 317-321.
- 193 Isola J, Tanner M, Forsyth A, Cooke TG, Watters AD, Bartlett JM (2004) Interlaboratory comparison of HER-2 oncogene amplification as detected by chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 10: 4793-4798.
- 194 Laakso M, Tanner M, Isola J (2006) Dual-colour chromogenic in situ hybridization for testing of HER-2 oncogene amplification in archival breast tumours. *J Pathol* 210: 3-9.
- 195 Lin F, Shen T, Prichard JW (2005) Detection of Her-2/neu oncogene in breast carcinoma by chromogenic in situ hybridization in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol* 33: 376-380.
- 196 Li-Ning TE, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino MJ (2005) Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. *Int J Surg Pathol* 13: 343-351.
- 197 Loring P, Cummins R, O'Grady A, Kay EW (2005) HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13: 194-200.
- 198 Mollerup J, Henriksen U, Muller S, Schonau A (2012) Dual color chromogenic in situ hybridization for determination of HER2 status in breast cancer: a large comparative study to current state of the art fluorescence in situ hybridization. *BMC Clinical Pathology* 12: 3.
- 199 Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY (2003) Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol* 16: 937-943.
- 200 Pedersen M, Rasmussen B (2009) The Correlation Between Dual-color Chromogenic In Situ Hybridization and Fluorescence In Situ Hybridization in Assessing HER2 Gene Amplification in Breast Cancer. *Diagnostic Molecular Pathology* 18: 96-102.
- 201 Pothos A, Plastira K, Plastiras A, Vlachodimitropoulos D, Goutas N, Angelopoulou R (2008) Comparison of chromogenic in situ hybridisation with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the assessment of her-2/neu oncogene in archival material of breast carcinoma. *Acta Histochem Cytochem* 41: 59-64.
- 202 Riethdorf S, Hoegel B, John B, Ott G, Fritz P, Thon S, Loening T, Pantel K (2011) Prospective multi-centre study to validate chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 gene amplification in specimens from adjuvant and metastatic breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- 203 Saez A, Andreu FJ, Segui MA, Bare ML, Fernandez S, Dinares C, Rey M (2006) HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast* 15: 519-527.
- 204 Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J (2000) Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 157: 1467-1472.

- 205 van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, Hofmann M, Kristel P, Penault-Llorca F, Ruschoff J (2007) Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Res* 9: R68.
- 206 Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA (2004) Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 128: 627-633.
- 207 Vocaturo A, Novelli F, Benevolo M, Piperno G, Marandino F, Cianciulli AM, Merola R, Donnorso RP, Sperduti I, Buglioni S, Mottolese M (2006) Chromogenic In Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Gene Amplification in Histological and ThinPrep®-Processed Breast Cancer Fine-Needle Aspirates: A Sensitive and Practical Method in the Trastuzumab Era. *The Oncologist* 11: 878-886.
- 208 Wixom CR, Albers EA, Weidner N (2004) Her2 amplification: correlation of chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12: 248-251.
- 209 Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z (2002) Determination of HER2 gene amplification by Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) in archival breast carcinoma 15: 657-665.
- 210 FDA, US Food and Drug Administration (2008) Invitrogen SPOT-Light® HER2 CISH™ Kit -P050040. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm074029.htm> (08.08.2012).
- 211 Carbone A, Botti G, Gloghini A, Simone G, Truni M, Curcio MP, Gasparini P, Mangia A, Perin T, Salvi S, Testi A, Verderio P (2008) Delineation of HER2 Gene Status in Breast Carcinoma by Silver in Situ Hybridization is Reproducible among Laboratories and Pathologists. *J Mol Diagn* 10: 527-536.
- 212 Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C (2004) Evaluation of the clinical significance of HER2 amplification by chromogenic in situ hybridisation in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 24: 2401-2406.
- 213 Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkanen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, Lundin J (2003) Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* 9: 923-930.
- 214 Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J (2007) Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: prognostic relevance. *Hum Pathol* 38: 26-34.
- 215 Bartlett JM, Campbell FM, Mallon EA (2008) Determination of HER2 amplification by in situ hybridization: when should chromosome 17 also be determined? *Am J Clin Pathol* 130: 920-926.
- 216 Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karesen R (2003) Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *Apmis* 111: 444-450.
- 217 Gunn S, Yeh IT, Lytvak I, Tirtorahardjo B, Dzidic N, Zadeh S, Kim J, McCaskill C, Lim L, Gorre M, Mohammed M (2010) Clinical array-based karyotyping of breast cancer with equivocal HER2 status resolves gene copy number and reveals chromosome 17 complexity. *BMC Cancer* 10: 396.
- 218 Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, Leiberman G, Slamon DJ (2005) Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer* 6: 240-246.
- 219 Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmoller P, Gutjahr T, Kaufmann M, Henkel T, Rüschoff J (2008) Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol* 61: 89-94.

- 220 Downey L, Livingston RB, Koehler M, Arbushites M, Williams L, Santiago A, Guzman R, Villalobos I, Di Leo A, Press MF (2010) Chromosome 17 polysomy without human epidermal growth factor receptor 2 amplification does not predict response to lapatinib plus paclitaxel compared with paclitaxel in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 16: 1281-1288.
- 221 Rosenberg CL (2008) Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true, and unrelated. *J Clin Oncol* 26: 4856-4858.
- 222 Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens MR, Paridaens R, De Wolf-Peeters C (2008) Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol* 26: 4869-4874.
- 223 Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R (2004) Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and PathVysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 121: 70-77.
- 224 Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A et al (2005) Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: Effect on daily practice. *Clinical Cancer Research* 11: 4393-4399.
- 225 Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B (2003) Impact of polysomy 17 on HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification. *J Mol Diagn*. 5(3): 155-159.
- 226 Kaufmann PA, Broadwater G, Lezon-Geyda K, Dressler LG, Berry D, Friedman S, Winer EP, Hudis C, Ellis MJ, Seidman AD, Harris, LN (2007) CALGB 150002: correlation of HER2 and chromosome 17 (ch17) copy number with trastuzumab (T) efficacy in CALGB 9840, paclitaxel (P) with or without trastuzumab in HER2+ and HER2- metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 25: suppl 1009.
- 227 Paik S, Kim C, Wolmark N (2008) HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 358: 1409-1411.
- 228 Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM (2001) Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 19: 2714-2721.
- 229 Sapino A, Coccorullo Z, Cassoni P, Ghisolfi G, Gugliotta P, Bongiovanni M, Arisio R, Crafa P, Bussolati G (2003) Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. *Histopathology* 43: 354-362.
- 230 Kreipe H, Thomssen C (2012) Pathologie, Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinom, Guidelines Breast. AGO e.V., Kommission Mamma.
- 231 Agus DB, Gordon MS, Taylor C, Natale RB, Karlan B, Mendelson DS, Press MF, Allison DE, Sliwkowski MX, Lieberman G, Kelsey SM, Fyfe G (2005) Phase I clinical study of Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23: 2534-2543.
- 232 Press MF, Finn RS, Cameron D, Di Leo A, Geyer CE, Villalobos IE, Santiago A, Guzman R, Gasparyan A, Ma Y, Danenberg K, Martin AM, Williams L, Oliva C, Stein S, Gagnon R, Arbushites M, Koehler MT (2008) HER-2 Gene amplification, HER-2 and Epidermal Growth Factor Receptor mRNA and protein expression, and Lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research* 14: 7861-7870.
- 233 Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, Ellis C, Casey M, Vukelja S, Bischoff J, Baselga J, O'Shaughnessy J (2010) Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 28: 1124-1130.

- 234 Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A, Cagossi K, Bisagni G, Sarti S, Ravaioli A, Cavanna L, Giardina G, Musolino A, Untch M, Orlando L, Artioli F, Boni C, Generali DG, Serra P, Bagnalasta M, Marini L, Piacentini F, D'Amico R, Conte PF (2012) Preoperative Chemotherapy Plus Trastuzumab, Lapatinib, or Both in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Operable Breast Cancer: Results of the Randomized Phase II CHER-LOB Study. *J Clin Oncol*, Published Ahead of Print on April 9, 2012 as 10.1200/JCO.2011.39.0823.
<http://jco.ascopubs.org/content/early/2012/04/09/JCO.2011.39.0823.full.pdf+html> (08.08.2012).
- 235 Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, Gómez H, Dinh P, Fauria K, Van Dooren V, Aktan G, Goldhirsch A, Chang T-W, Horváth Z, Coccia-Portugal M, Domont J, Tseng L-M, Kunz G, Sohn JH, Semiglazov V, Lerzo G, Palacova M, Probachai V, Puztai L, Untch M, Gelber RD, Piccart-Gebhart M (2012) Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet* 379: 633-640.
- 236 Baselga J, Cortés J, Kim S-B, Im S-A, Hegg R, Im Y-H, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM (2012) Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 366: 109-119.
- 237 Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, Tseng L-M, Liu M-C, Lluch A, Staroslawska Eb, de la Haba-Rodriguez J, Im S-A, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G, Valagussa P (2012) Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 13: 25-32.
- 238 Fischer D, Röder K, Dittmer C, Diedrich K, Thill M (2009) "Targeted therapy" des Mammakarzinoms. *Der Gynäkologe* 42: 157-163.
- 239 Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L (2012) Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 16-32.
- 240 Tacha DE, Alba Dominguez J, Gutierrez Bernal J, Henshall-Powell R, Vargas J, DeGolia C, Kyshtoobayeva A, Alba Losada J (2009) A multi-method analysis of c-erbB2/HER2 in FFPE tissue: Comparison of a novel Rapid in situ Hybridization procedure (RISH™), HER2 CISH and IHC. *San Antonio Breast Cancer Symposium*, San Antonio, abstract 6009, poster, <http://biocare.net/wp-content/uploads/SABCS-2010-Poster-Session-Brochure-RISH-CISH.pdf> (08.08.2012).
- 241 Orjalo A, Johansson HE, Ruth JL (2011) Stellaris[trade] fluorescence in situ hybridization (FISH) probes: a powerful tool for mRNA detection, *Nat Meth* 8. published online 29 September 2011 (08.08.2012).
- 242 Panomics, Affymetrix, Inc. (2010) QuantiGene® ViewRNA Assay: Simple, robust, and sensitive visualization of mRNA for in situ analysis.
http://www.panomics.com/downloads/WH112%20White%20paperQG%20ViewRNA_FIN_AL.pdf (08.08.2012).

THESEN

1. Die exakte Definition des Algorithmus der HER2-Bestimmung ist von enormer Bedeutung, da das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung als auch die häufigste Todesursache in der Gruppe der malignen Tumoren der Frau ist.
2. Der positive HER2-Status ist in weniger als 20 % der Mammakarzinome nachweisbar.
3. Der HER2-Status ist ein Prognosefaktor für das Mammakarzinom.
4. Der HER2-Status ist ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf die zielgerichtete Therapie mit Trastuzumab und Lapatinib.
5. Für die neoadjuvante Therapie ist die Zuverlässigkeit der Diagnostik anhand der Stanzbiopsie enorm wichtig.
6. Die CISH zeigt eine hohe Konkordanz bei guter zufallskorrigierter Übereinstimmung der Ergebnisse anhand der Stanze mit denen des Resektates.
7. Die FISH zeigt eine hohe Konkordanz bei guter zufallskorrigierter Übereinstimmung der Ergebnisse anhand der Stanze mit denen des Resektates.
8. Dennoch detektiert das Resektat mehr ISH positive Fälle, begründbar im größeren Tumorausschnitt.
9. Die CISH Ergebnisse innerhalb der Stanze und Resektatgruppe stimmen anhand der Konkordanz und zufallskorrigierten Übereinstimmung sehr gut mit den FISH Ergebnissen überein. Die CISH ist demnach der FISH mindestens gleichwertig bei methodischen und finanziellen Vorteilen.
10. Unser Kollektiv ist bei einem Anteil von 18 % HER2 positiver Patienten (IHC3+ und/oder ISH positiv) mit dem Gesamtkollektiv unserer Klinik als auch regionalen statistischen Erfassungen vergleichbar.

11. Unser Kollektiv ist hinsichtlich der Korrelation CISH/FISH den Studien aus der Literatur vergleichbar.
12. Der HER2-Status sollte mittels IHC Bestimmung aus der Stanzbiopsie oder des Resektates und folgender ISH des Resektates erfolgen.
13. Solange das Ansprechen der IHC3+/ISH negativen Fälle umstritten ist, müssen diese als HER2 positiv angesehen werden. Demnach ist immer eine immunhistochemische Untersuchung der Mammakarzinome durchzuführen.
14. Die Bestimmung der Hormonrezeptoren kann sowohl aus Stanze als auch Resektat erfolgen. Und sollte bei negativem Ergebnis weiter überprüft werden.
15. Bei neoadjuvanten Therapievorgehen sollten generell ER, PgR und HER2 von beiden Gewebetypen bestimmt werden, da eine Komplettremission als auch eine Änderung des Expressionsprofils nicht auszuschließen sind.

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei allen Menschen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. med. Christoph Thomssen danke ich für die Ermöglichung der Promotion, die gute Betreuung und die konstruktive Kritik und Unterstützung bei ihrer Fertigstellung.

Ein großes Danke an Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Holzhausen, der mir bei dem Erlernen der Befundung der Schnitte und auch selbst immer tatkräftig zur Seite stand.

Herrn Prof Dr. Andreas Stang möchte ich für die unbegrenzte Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten und die anregenden Gesprächsrunden danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Regina Große für die Unterstützung bei der Antragstellung und den Korrekturen, als auch dem Einbringen neuer Ideen.

Weiterhin danke ich allen MTA`s des Institutes für Pathologie für die Unterstützung bei der Erstellung des Kollektives, der Durchführung der Detektionsmethoden und der Anfertigung der Schnitte.

Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus, Dresden (Direktor: Prof. Dr. med. Gustavo Bruno Baretton) danke ich für die Durchführung und Befundung der FISH.

Außerdem hätte diese Arbeit ohne die finanzielle und sehr gute beratende Unterstützung der Firmen ROCHE, GlaxoSmithKline und Zytomed-Systems nicht umgesetzt werden können.

Der größte Dank gebührt jedoch Stephan, meiner Familie und allen Freunden für das Verständnis und die unbegrenzte Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Vera Wolf, geb. Spohn
geboren am 09.01.1981 in Halle/Saale
verheiratet

Berufsausbildung

seit 08/2012

Specialty Registrar (Assistenzärztin)
Department for Obstetrics and Gynaecology
Watford General Hospital (Großbritannien)
(Direktor: Dr. A. Boret)

10/2011-07/2012

arbeitssuchend in Großbritannien

08/2006-09/2011

Assistenzärztin in Weiterbildung
Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. C. Thomssen)

Promotion

seit 2006

Nachweis des HER2-Status in Stanzbiopsie
und korrelierendem OP-Präparat bei
Mammakarzinomen: Ein Vergleich der drei
etablierten Methoden (HercepTest™, CISH,
FISH)

Hochschulausbildung

1999-2006

Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

09/2004 - 12/2004

Austauschsemester: Université de Henry
Poincaré I of Nancy/France (funded by
ERASMUS-program)

2006

3.Staatsexamen, Approbation

Schulbildung

1991-1999

Gymnasium "Thomas Müntzer" in Halle/Saale
Allgemeine Hochschulreife

1987-1991

Grundschule Kröllwitz in Halle/Saale

Harpenden, 02.09.2012

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit an der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbständig und ohne fremde Hilfe erarbeitet und verfasst habe. Ferner habe ich nur die in der Dissertation angegebenen Literaturstellen und Hilfsmittel verwendet und die entnommenen und benutzten Literaturstellen auch als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die vorliegende Arbeit bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Harpenden, den 02.09.2012

Vera Wolf

PUBLIKATION VON ERGEBNISSEN DIESER ARBEIT

Wolf V, Große R, Erggelet J, Holzhausen HJ, Hauptmann S, Thomssen C (2009): The reliability of HER2-status determination from core-needle-biopsies and surgical specimens: A comparison of two established test methods (IHC, CISH). *J Clin Oncol* 27: 15S. (suppl. Abstr. e22141).

Wolf V; Grosse R.; Erggelet J.; Holzhausen HJ, Hauptmann S, Thomssen C (2009): Correlation of immunohistochemical detection of the human epidermal growth factor receptor Type 2 (HER2), the Estrogen receptor (ER) and the progesterone receptor (PR) on punch biopsy and correlated surgical specimen in breast cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 69 (8): 767-767.

Wolf V; Grosse R.; Holzhausen HJ, Stang A, Hauptmann S, Thomssen C (2010): The HER2-status of the core biopsy and correlating surgical preparation for breast cancer: A comparison of the three established methods (HercepTest™, CISH, FISH). *Onkologie* 33(2): 144-145.