

Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie  
(Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Der HER-2-Status im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom:  
Positivitätsrate, mögliche prädiktive und prognostische Bedeutung**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Hanna Styczen  
aus  
Nowy Sacz (Neusandez/Polen)  
Göttingen 2013

**D e k a n:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Liersch

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Trümper

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Ströbel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2013

---

# Inhaltsverzeichnis

|             |   |             |
|-------------|---|-------------|
| <b>I.</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>   | <b>IV</b>   |
| <b>II.</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>III.</b> | <b>Tabellenverzeichnis.....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>1</b>    | <b>Einleitung.....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>1.1</b>  | <b>Ätiopathogenese kolorektaler Karzinome .....</b>   | <b>2</b>    |
| <b>1.2</b>  | <b>Klassifikation kolorektaler Karzinome .....</b>  | <b>3</b>    |
| 1.2.1       | TNM-Klassifikation .....  | 4           |
| 1.2.2       | Stadieneinteilung nach UICC.....  | 4           |
| <b>1.3</b>  | <b>Therapiealgorithmen für die Therapie des Rektumkarzinoms .....</b>   | <b>5</b>    |
| 1.3.1       | Neoadjuvante Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms.....  | 6           |
| 1.3.2       | Operative Strategien der Rektumresektion.....   | 8           |
| 1.3.3       | Adjuvante Systemtherapie .....  | 9           |
| <b>1.4</b>  | <b>Konzepte zur Individualisierung der onkologischen Therapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (UICC II/III) .....</b> | <b>9</b>    |
| <b>1.5</b>  | <b>Prädiktive und prognostische Marker in der Therapie des Rektumkarzinoms.....</b>   | <b>10</b>   |
| <b>1.6</b>  | <b>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2/neu) .....</b>   | <b>11</b>   |
| 1.6.1       | Struktur und Funktion.....  | 11          |
| 1.6.2       | Tumorbiologische Bedeutung von HER-2 .....  | 13          |
| 1.6.3       | Klinisch-therapeutische Relevanz des HER-2-Status bei HER-2-positiven Karzinomen .....  | 14          |
| 1.6.4       | Detektionsmethoden des HER-2-Status .....   | 15          |
| <b>1.7</b>  | <b>Zielsetzung und Fragestellung.....</b>   | <b>16</b>   |
| <b>2</b>    | <b>Patientenkollektiv, Materialien und Methoden.....</b>  | <b>17</b>   |
| <b>2.1</b>  | <b>Untersuchtes Patientenkollektiv .....</b>  | <b>17</b>   |
| <b>2.2</b>  | <b>Prätherapeutisches Tumorstaging.....</b>   | <b>18</b>   |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.3      | Studiendesign.....  | 18        |
| 2.4      | Prätherapeutische Parameter .....   | 21        |
| 2.5      | Materialien .....   | 23        |
| 2.6      | Perioperative Qualitätssicherung, histopathologische Aufbereitung und Beurteilung des residuellen Tumorgewebes.....       | 23        |
| 2.7      | Histopathologische Beurteilung nach neoadjuvanter Radiochemotherapie .....  | 25        |
| 2.8      | Immunhistochemische Analysen.....   | 25        |
|          | 2.8.1 Schnittanfertigung .....  | 27        |
|          | 2.8.2 Färbeprotokoll .....  | 27        |
|          | 2.8.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....   | 28        |
| 2.9      | Dual-in-situ-Hybridisierung.....  | 34        |
|          | 2.9.1 Färbeprotokoll der Dual-ISH .....   | 36        |
|          | 2.9.2 Auswertung der Dual-ISH-Färbungen .....   | 36        |
| 2.10     | Follow-Up-Untersuchungen .....  | 40        |
| 2.11     | Statistische Analysen.....  | 40        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>41</b> |
| 3.1      | Resektionsverfahren .....   | 41        |
| 3.2      | Histopathologisches Tumorstaging .....  | 42        |
| 3.3      | Klinischer Langzeitverlauf .....  | 45        |
| 3.4      | HER-2-Status in prätherapeutischen Biopsien .....   | 47        |
| 3.5      | HER-2-Status im Rektumkarzinomresektat.....   | 48        |
| 3.6      | Vergleich des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem HER-2-Status aus Tumorgewebe nach Rektumresektion..... | 49        |
| 3.7      | Korrelation des HER-2-Status prätherapeutischer Biopsien und von Tumorresektaten mit klinischen Parametern .....          | 50        |
| 3.8      | Korrelation des HER-2-Status mit dem tumorfreien und tumorspezifischen Überleben .....                                    | 54        |
|          | 3.8.1 Korrelation des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem DFS und CSS .....                              | 55        |
|          | 3.8.2 Korrelation des HER-2-Status aus Tumorgewebe nach Rektumresektion mit dem DFS und CSS .....                         | 58        |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.9      | Subgruppenanalyse: Korrelation des HER-2-Status mit dem DFS und CSS unter Berücksichtigung des Nodalstatus .....   | 62        |
| 3.10     | Univariate und multivariate Analysen.....  | 64        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>65</b> |
| 4.1      | Expressions- und Genamplifikationsmuster von HER-2 beim Rektumkarzinom .....                                       | 65        |
| 4.2      | HER-2 als histopathologischer Biomarker.....   | 68        |
| 4.3      | Prognostische Relevanz der HER-2-Überexpression und HER-2-Genamplifikation hinsichtlich des Gesamtüberlebens ..... | 70        |
| 4.4      | Vergleich des prognostischen Potentials von HER-2 in weiteren Tumorentitäten.....                                  | 71        |
| 4.5      | Anti-HER-2-Therapien: klinische Relevanz und Ausblick .....  | 73        |
| 4.6      | Tumorbiologie von HER-2 und EGFR.....  | 76        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>6</b> | <b>Anhang .....</b>  | <b>79</b> |
| 6.1      | TNM- und UICC-Klassifikationen .....   | 79        |
| 6.2      | Verwendete Materialien und Geräteliste .....   | 80        |
| 6.3      | Studienprotokolle.....   | 81        |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>83</b> |

---

## I. Abkürzungsverzeichnis

|          |  |
|----------|--|
| A.       | Arteria  |
| AEG      | Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs             |
| AIO      | Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie               |
| AP       | Alkalische Phosphatase                                     |
| APC      | Adenomatöse Polyposis Coli (Tumorsuppressorgen)            |
| APE      | Abdomino-perineale Rektumexstirpation                      |
| ARO      | Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie                |
| ARR      | Anteriore Rektumresektion                                  |
| CAO      | Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie             |
| CEA      | Carcino-Embryonales-Antigen; Tumormarker                   |
| c-erb-B2 | Cellular avian erythroblastosis homologue B2               |
| Chr      | Chromosom  |
| CISH     | Chromogenic-in-situ-hybridization                          |
| cm       | Zentimeter   |
| CRM      | Zirkumferentieller Resektionsrand                          |
| CSS      | Cancer Specific Survival, krankheitsspezifisches Überleben |
| CT       | Computertomographie  |
| CTx      | Chemotherapie  |
| DAB      | Diaminobenzidin  |
| DFS      | Disease Free Survival, krankheitsfreies Überleben          |

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| DIG                           | Digoxigenin  |
| DNA                           | Deoxyribonucleic Acid  |
| DNP                           | Dinitrophenyl  |
| EGFR                          | Epidermal Growth Factor Receptor                               |
| FAP                           | Familiäre adenomatöse Polyposis                                |
| FDA                           | Food and Drug Administration                                   |
| FISH                          | Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung                             |
| FMR                           | Fernmetastasierungsrate  |
| FOLFOX                        | Therapieregime mit 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin            |
| 5-FU                          | 5-Fluorouracil   |
| G                             | Grading, Differenzierungsgrad                                  |
| GRCSG                         | German Rectal Cancer Study Group                               |
| Gy                            | Grey   |
| HER-2                         | Human Epidermal Growth Factor Receptor-2                       |
| HNPCC                         | Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid   |
| HRP                           | Horseradish Peroxidase   |
| IHC                           | Immunhistochemie   |
| ISH                           | In-Situ-Hybridisierung   |
| KFO                           | Klinische Forschergruppe                                       |
| KRK                           | Kolorektales Karzinom  |

---

|             |   |
|-------------|---|
| LK          | Lymphknoten   |
| LKR         | Lokalrezidivrate  |
| MAPK        | Mitogen-activated protein kinase                                |
| Min         | Minuten   |
| mKRR        | metastasiertes kolorektales Karzinom                            |
| ml          | Milliliter  |
| MRT         | Magnetresonanztomographie                                       |
| OS          | Overall Survival  |
| pCR         | pathologische Komplettremission                                 |
| PCR         | Polymerase Chain Reaction                                       |
| PME         | Partielle Mesorektale Exzision                                  |
| R           | Resektionsstatus, Residualstatus                                |
| RCT         | Radiochemotherapie  |
| RNA         | Ribonucleic acid  |
| RT          | Radiotherapie   |
| rUS         | rektale Endosonographie   |
| TARR        | Tiefe anteriore Rektumresektion                                 |
| TKI         | Tyrosinkinase-Inhibitoren                                       |
| TME         | Totale Mesorektale Exzision                                     |
| TNM         | Klassifikationssystem maligner Tumore                           |
| ToGA-Studie | Trastuzumab for HER2-positive metastatic Gastric cancer - Trial |

---

|      |  |
|------|--|
| TRG  | Tumor Regression Grading/ Tumorregressionsgrad |
| UICC | Union Internationale Contre le Cancer          |
| WHO  | World Health Organization                      |

---

## II. Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: „Adenom-Karzinom-Sequenz“  | 3  |
| Abbildung 2: Langzeitergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie und erste Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-04-Studie  | 7  |
| Abbildung 3: Signaltransduktionswege von EGFR   | 12 |
| Abbildung 4: Studiendesign  | 20 |
| Abbildung 5: Modell der IHC-HER-2-Gewebefärbung   | 26 |
| Abbildung 6: HER-2-IHC-Testalgorithmus beim Magen- und Rektumkarzinom                                     | 31 |
| Abbildung 7: HER-2-Scoring beim Rektumkarzinom  | 32 |
| Abbildung 8: HER-2-Diagnostik beim Rektumkarzinom   | 33 |
| Abbildung 9: Modell der Dual-ISH-Färbungen  | 35 |
| Abbildung 10: HER-2-Dual-ISH-Testalgorithmus  | 38 |
| Abbildung 11: HER-2-Dual-ISH-Färbungen  | 39 |
| Abbildung 12: HER-2-Status in prätherapeutischen Biopsien   | 47 |
| Abbildung 13: HER-2-Status im Rektumkarzinomresektat  | 48 |
| Abbildung 14: Vergleich des HER-2-Status der Biopsie mit dem korrespondierenden Resektat                  | 49 |
| Abbildung 15: Korrelation des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem DFS                    | 55 |
| Abbildung 16: Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien mit dem CSS                                       | 56 |
| Abbildung 17: Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien von Patienten mit einem (y)pN+ Status und dem CSS | 57 |
| Abbildung 18: Tumorfrees 5-Jahres- und 12.5-Jahres-Überleben im Vergleich                                 | 58 |
| Abbildung 19: Therapieschemata in Abhängigkeit des HER-2-Status und Korrelation mit dem DFS               | 59 |
| Abbildung 20: Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben  | 60 |
| Abbildung 21: Tumorspezifisches 12.5-Jahres-Überleben   | 61 |
| Abbildung 22: Subgruppenanalyse   | 62 |

---

### III. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: TNM-Klassifikation .....   | 4  |
| Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC .....  | 5  |
| Tabelle 3: Unterteilung der Patientenkollektive .....   | 19 |
| Tabelle 4: Patientenkohorten und prätherapeutische Charakterisierung .....                                    | 22 |
| Tabelle 5: Tumorregressionsgrad.....  | 25 |
| Tabelle 6: HER-2-Diagnostik beim Mamma-, Magen- und Rektumkarzinom.....                                       | 29 |
| Tabelle 7: Charakterisierung der Subkollektive nach Operationsmethoden .....                                  | 41 |
| Tabelle 8: Charakterisierung der Subkollektive mit postoperativen, kliniko-<br>pathologischen Parametern..... | 44 |
| Tabelle 9: Korrelation der Follow-Up-Daten .....  | 46 |
| Tabelle 10: HER-2-Expression und -Genamplifikation in cUICC-II/-III Rektumkarzinomen ----                     | 51 |
| Tabelle 11: Vergleich des HER-2-Status mit prätherapeutischen und operativen<br>Parametern .....              | 52 |
| Tabelle 12: Vergleich des HER-2-Status mit postoperativen Parametern.....                                     | 53 |
| Tabelle 13: Univariate und multivariate Analysen.....   | 63 |

## 1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist nach dem Mammakarzinom der Frau und dem Prostatakarzinom des Mannes die zweithäufigste Malignomerkrankung in Deutschland und dritthäufigste Krebserkrankung in den Vereinigten Staaten von Amerika (Robert Koch Institut 2012; Jemal et al. 2011). Aufgrund des demographischen Wandels ist besonders in den westlichen Industrieländern ein Anstieg der Neuerkrankungen (absolute Fallzahlen) in den letzten zwei Jahrzehnten zu verzeichnen.

Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 65.390 Neuerkrankungen (35.350 Männer und 30.040 Frauen) des KRK registriert, von denen 30% im Rektum lokalisiert waren. Niedersachsen ist bezüglich der Inzidenzrate überdurchschnittlich vertreten (gemessen an der Inzidenzrate in der gesamten Bundesrepublik) und belegt geschlechtsunabhängig leider eine Spitzenposition. Während die altersstandardisierte Sterberate (Mortalität) in den letzten 10 Jahren um mehr als 20% gesunken ist, bleibt das KRK die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Robert Koch Institut 2012).

Auf Grund der hohen Prävalenz und Mortalität stellt das KRK nicht nur einen bedeutenden medizinisch relevanten Faktor dar, sondern hat auch im Hinblick auf den Anstieg der Inzidenzen im fortgeschrittenem Alter und der in unserer Gesellschaft immer weiter steigenden Lebenserwartung einen hohen sozioökonomischen Stellenwert (Liersch et al. 2005).

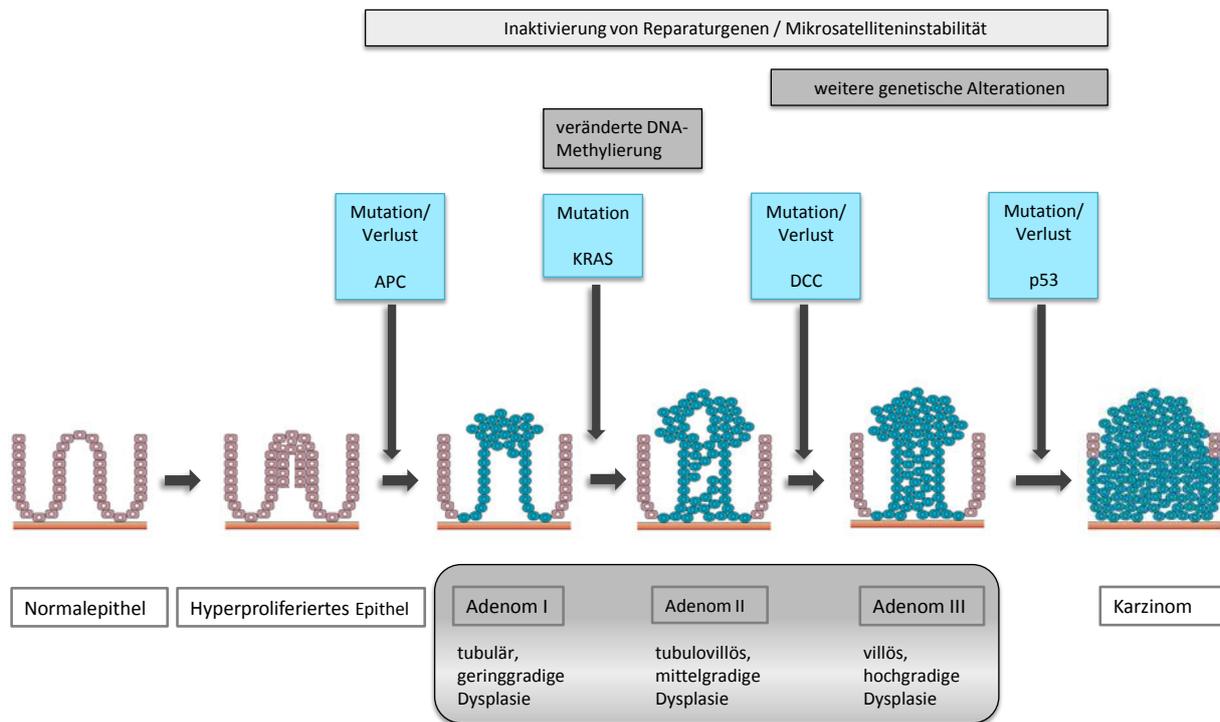
Laufende klinische Studien zum KRK und insbesondere zum Rektumkarzinom setzen ihren Fokus auf die Intensivierung der bereits etablierten multimodalen Therapie, um die Fernmetastasierungsrate als Prognose-limitierenden Faktor zu verringern, sowie auf die Identifikation prädiktiver und prognostischer Biomarker und mögliche neue Ansätze für eine personalisierte Behandlung. In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Arbeit HER-2 im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom als Biomarker untersucht, der bereits als Biomarker und *Target* für eine Antikörper-adaptierte Therapie im Mamma- sowie im metastasierten Magenkarzinom bekannt ist und sich in der Klinik etabliert hat.

## 1.1 Ätiopathogenese kolorektaler Karzinome

Zu den Risikofaktoren, die ursächlich an der Entwicklung eines KRK beteiligt sind, zählen genetische Prädispositionen, Ernährungsstile (fettreiche und fleischreiche Kost), Risikoerkrankungen wie beispielsweise chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (insbesondere Kolitis ulcerosa) sowie endogene/ metabolische Einflüsse wie langjähriges Zigarettenrauchen, hoher Alkoholkonsum und körperliche Inaktivität. Überdies steigt die Inzidenz des KRK mit fortgeschrittenem Alter an - das heißt 90% der KRK werden nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert.

Ätiopathogenetisch entstehen KRK in über 90% der Fälle auf dem Boden von benignen intraepithelialen Neoplasien (Arasteh et al. 2009). Dieses als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bezeichnete Modell wurde erstmals von Muto et al. (1975) postuliert und durch Vogelstein et al. (1988) erweitert. Über einen Zeitraum von 10-15 Jahren führt die sequentielle Abfolge von verschiedenen genetischen Mutationen, infolgedessen Proto-Onkogene (z.B. KRAS) aktiviert und/ oder Tumorsuppressorgene (z.B. APC-Gen) inaktiviert werden, zu einer malignen Transformation des Normalgewebes mit einem unkontrollierten malignen Wachstum (s. Abbildung 1). Das Entartungsrisiko ist dabei abhängig von dem histologischen Aufbau (tubulös, villös, tubulovillös) und der Größe der Adenome (Arasteh et al. 2009).

Die „Adenom-Karzinom-Sequenz“ kann im Rahmen genetischer Syndrome wie beispielsweise der erblich bedingten familiären adenomatösen Polyposis (FAP) beschleunigt sein und bereits im jungen Lebensalter mit einem hohen Entartungsrisiko einhergehen. Ursächlich für die FAP ist eine Keimbahnmutation, durch die das Tumorsuppressorgen APC inaktiviert wird. Weiterhin werden in seltenen Fällen neben der beschriebenen „Adenom-Karzinom-Sequenz“ auch genetische Mutationen verschiedener DNA-Reparatur-Gene (z.B. MLH1, MSH2, MSH6) für die Entstehung eines KRK verantwortlich gemacht. Im hereditären non-polypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC; Lynch-Syndrom), welches 5% der KRK ausmacht, konnten Differenzen der Sequenzlängen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Abschnitte (Mikrosatelliteninstabilität) nachgewiesen werden, die auf Grund defekter DNA-Reparatur-Proteine zu einer fehlerhaften DNA-Replikation führen und somit die Karzinogenese begünstigen.



**Abbildung 1: „Adenom-Karzinom-Sequenz“ (modifiziert nach Davies et al. 2005, S.202)**

Die Abbildung stellt die Karzinogenese von KRK an Hand des Modells der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ dar (Vogelstein et al. 1988). Innerhalb eines Zeitraums von 10-15 Jahren wandelt sich das Normalgewebe in sequenzieller Abfolge durch unterschiedliche Faktoren in ein polypöses Adenom bis hin zu einem invasiven Karzinom um. Verantwortlich für die maligne Transformation können Mutationen oder Inaktivierung von bestimmten Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen sowie eine Mikrosatelliteninstabilität (Inaktivierung von Reparaturgenen) sein.

## 1.2 Klassifikation kolorektaler Karzinome

Kolorektale Karzinome werden entsprechend ihrem Tumorsitz in Kolon- und Rektumkarzinome unterteilt. Nach den aktuellen UICC (Union internationale contre le cancer)- und TNM-Klassifikationen gelten Adenokarzinome als Rektumkarzinome, sofern der Abstand zwischen distalem Tumorrand und der Anokutanlinie (gemessen mit der tiefen, starren Rektoskopie)  $\leq 16\text{cm}$  entfernt liegt (Becker und Liersch 2006; Liersch et al. 2005). Demnach sind sämtliche Tumore oberhalb von 16cm (ab anokutan) als Kolonkarzinome definiert und werden standardmäßig primär operiert sowie mit einer postoperativen Chemotherapie (CTx) behandelt, sofern es sich um die UICC-Tumorstadien II - „high-risk“ (T4 Tumor, Tumorperforation, etc.) - und UICC-Tumorstadien III (mit LK-Metastasen) handelt (s. Tabelle 2). Sämtliche untersuchten Patienten in dieser Arbeit wurden nach den in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschriebenen Klassifikationen eingeteilt. Die aktuellen TNM- und UICC-Klassifikationen sind zusätzlich im Anhang hinterlegt.

### 1.2.1 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation stuft maligne Tumore nach Tumorinfiltration (T-Status), Lymphknotenstatus (N-Status) und dem Auftreten von Metastasen (M) ein (s. Tabelle 1).

An Hand des prätherapeutischen klinischen Stagings (Ergebnisse aus klinischem Untersuchungsbefund, rektaler Endosonographie, Röntgen-Thorax, aus einer möglichenfalls erfolgten chirurgischen Exploration, Zytologien und Biopsien) wird eine vorläufige klinische cTNM-Klassifikation ermittelt. Diese wird nach erfolgter Rektumresektion revidiert, sobald die pathologische Analyse des Rektumkarzinomresektates und der entnommenen lokoregionären Lymphknoten (LK) erfolgt ist (pTNM-Klassifikation). Die histopathologische Aufbereitung des nativen Resektates erfolgt nach standardisierten etablierten Richtlinien und Klassifikationen (s. Kapitel 2.6). Für die zuverlässige Ermittlung der lymphogenen Metastasierung wird die histopathologische Beurteilung von  $\geq 12$  lokoregionären LK gefordert (Schmiegel et al. 2010).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation (modifiziert nach Sobin 2003, S. 19-22)**

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>T-Status</b>   |   |
| Tis               | Carcinoma in situ   |
| T1                | Infiltration der Submukosa                                    |
| T2                | Infiltration der Muscularis propria                           |
| T3                | Infiltration der Subserosa und des perirektalen Gewebes       |
| T4                | Penetration angrenzender Organe oder in viszerales Peritoneum |
| <b>N-Status</b>   |   |
| N1                | Metastasen in 1-3 regionären LK                               |
| N2                | Metastasen in 4 oder mehr regionären LK                       |
| <b>Metastasen</b> |   |
| M1                | Fernmetastasen  |

### 1.2.2 Stadieneinteilung nach UICC

Die Stadieneinteilung nach UICC ist im Gegensatz zu der TNM-Klassifikation eine Einteilung zur Prognoseabschätzung und dient zumeist einer praktikableren Therapiestratifizierung (s. Tabelle 2).

Das klinische präoperative Staging (s. Kapitel 1.2.1) ermöglicht dabei die prätherapeutische cUICC-Klassifikation und daran orientiert finden die multimodalen Therapiekonzepte beim Rektumkarzinom statt.

**Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC (modifiziert nach Sobin 2003; S. 19-22)**

| UICC          | T-Status | N-Status | Metastasen |
|---------------|----------|----------|------------|
| Stadium 0     | Tis      | N0       | M0         |
| Stadium I     | T1, T2   | N0       | M0         |
| Stadium II A  | T3       | N0       | M0         |
| Stadium II B  | T4       | N0       | M0         |
| Stadium III   | Jedes T  | N1, N2   | M0         |
| Stadium III A | T1, T2   | N1       | M0         |
| Stadium III B | T3, T4   | N1       | M0         |
| Stadium III C | Jedes T  | N2       | M0         |
| Stadium IV    | Jedes T  | Jedes N  | M1         |

### 1.3 Therapiealgorithmen für die Therapie des Rektumkarzinoms

Die Entscheidung über die onkologisch adäquate Behandlung von Patienten mit einem Rektumkarzinom erfolgt in Abhängigkeit von der prätherapeutischen Diagnostik (Stagingprozeduren) und Tumorstadien-adaptiert. Die differenzierten Behandlungskonzepte erfordern eine fachübergreifende Kooperation zwischen Gastroenterologie, Radiologie, Strahlentherapie/ Radioonkologie, Allgemein- und Viszeralchirurgie, Pathologie und internistischer Onkologie.

Lokal begrenzte Rektumkarzinome (UICC-I-Stadium) mit "low-grade" Differenzierung (cT1, Differenzierungsgrad G1-G2) werden primär lokalen Resektionsverfahren (transanaler mikrochirurgischer Vollwandexzision oder transanaler Exzision) zugeführt (Gaedcke und Liersch et al. 2011). Schlecht differenzierte "high-grade" -Karzinome (cT1, G3-4) werden auf Grund einer zu erwartenden LK-Metastasierungsrate (bis zu 10%) nicht lokal, sondern radikal offen-chirurgisch unter Mitnahme des mesorektalen Lymphabstromgebiets reseziert (entweder mittels einer partiellen mesorektalen Exzision (PME) oder einer totalen mesorektalen Exzision (TME)). Ebenfalls werden cT2-Rektumkarzinome ohne Nachweis von LK-Metastasen im Staging (UICC-I-Stadium) primär transabdominell per TME operiert.

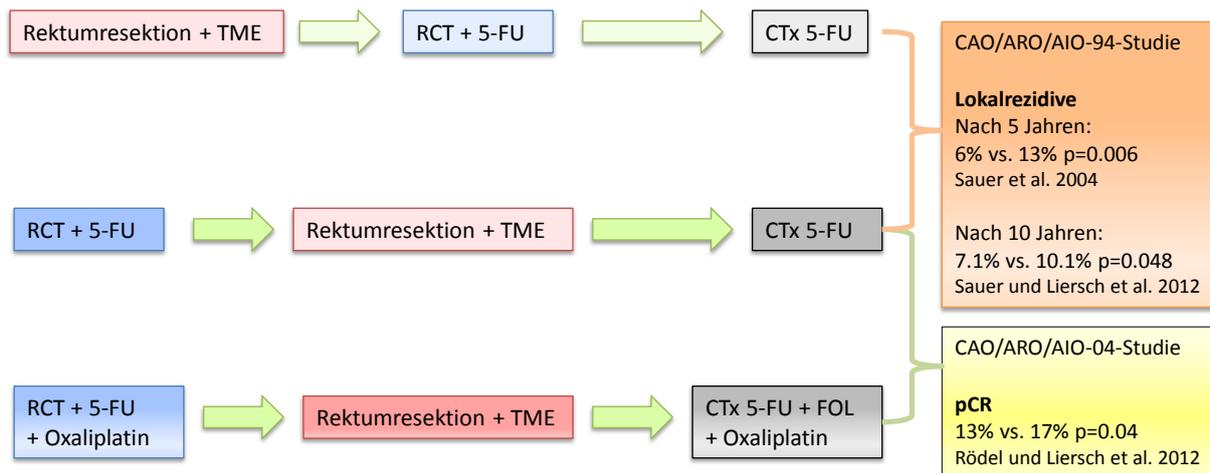
Bei klinisch lokal fortgeschrittenen cUICC-II/-III-Rektumkarzinomen besteht in Abhängigkeit der Tumorlokalisation die Indikation zur multimodalen Therapie. Diese setzt sich aus folgenden Therapiekomponenten zusammen:

- Präoperative konventionelle fraktionierte RT (50.4 Gy über 5 Wochen in 28 Einzelfraktionen à 1.8 Gy pro Tag) kombiniert mit 5-Fluorouracil (5-FU) -basierter CTx gefolgt von einem 4-6-wöchigen therapiefreien Intervall und anschließender radikaler Rektumresektion inklusive TME und einer postoperativen CTx (Liersch et al. 2005).
- Tumore, die im oberen Rektumdrittel lokalisiert sind, werden primär operiert (im Rahmen der GAST-05-Studie randomisiert per PME oder TME) und erhalten eine adjuvante CTx mit 5-FU.

### 1.3.1 Neoadjuvante Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms

Die multimodale Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms hat in den letzten 10 Jahren erhebliche Fortschritte erzielt. Auf Grund der exzellenten Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie (s. Abbildung 2; Fördernummer der Krebshilfe: 70-587) ist die neoadjuvante Radiochemotherapie (RCT) bei Tumoren, die im mittleren und unteren Rektumdrittel lokalisiert sind, der Gold-Standard (Soreide 1997; Schmiegel et al. 2010). Im Unterschied dazu werden cUICC-II/III-Rektumkarzinome mit Lokalisation im oberen Rektumdrittel im Rahmen der prospektiven multizentrischen GAST-05-Studie (internationale Studiennummer: ISRCTN35198481) primär operiert und erhalten nach Randomisation entweder eine TME oder PME. Die postoperative Behandlung wird mit einer adjuvanten CTx (5-FU mono oder 5-FU in Kombination mit Oxaliplatin als modifiziertes FOLFOX-Schema) komplettiert (Gaedcke und Liersch et al. 2011; Liersch et al. 2005; Schmiegel et al. 2010).

Innerhalb der CAO/ARO/AIO-94-Studie war es möglich, durch die Behandlung mit dem neoadjuvanten RCT-Regime einen *Downsizing* (Regression der Tumordinfiltration; T-Status *Downsizing*)- und *Downstaging*-Effekt zu erzielen. Zudem erhöht sich entgegen der initialen Einschätzung nach neoadjuvanter RCT die Wahrscheinlichkeit (bis zu 19%, Sauer et al. 2004) eines kontinenserhaltenden Resektionsverfahrens (unter Sphinktererhalt) und kann somit zu einer Verbesserung der Lebensqualität des Patienten beitragen (Sauer et al. 2004; Francois et al. 1999).



**Abbildung 2: Langzeitergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie und erste Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-04-Studie**

Dargestellt sind die Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94- und der CAO/ARO/AIO-04-Studie (Sauer et al. 2004; Sauer und Liersch et al. 2012; Rödel und Liersch et al. 2012). Der Prüfarm der CAO/ARO/AIO-94-Studie mit neoadjuvanter RCT, anschließender OP mit TME und adjuvanter CTx (5-FU) wird in der Nachfolgestudie zum Kontrollarm. Die CAO/ARO/AIO-04-Studie umfasst ein intensiviertes Behandlungsschema mit neoadjuvanter RT in Kombination mit einer CTx bestehend aus 5-FU und Oxaliplatin, nachfolgender Rektumresektion und TME und einem adjuvanen modifizierten FOLFOX-Schema.

Die Studie zeigte eine Verbesserung der 5-Jahres-Lokalrezidivrate durch die präoperative RCT von 13% in der Kontrollgruppe (primäre Operation mit adjuvanter RCT) auf 6% (Sauer et al. 2004). Ein signifikanter Effekt bezüglich der Korrelation des krankheitsfreien Überlebens (Disease Free Survival, DFS) oder des Gesamtüberlebens (Overall Survival, OS) mit den unterschiedlichen Behandlungsmethoden konnte nach 5 Jahren sowie entsprechend in den aktuell vorgestellten Resultaten nach 10 Jahren nicht beobachtet werden (Sauer und Liersch et al. 2012). Durch die Kombination der RT mit einer intensivierten CTx bestehend aus 5-FU und Oxaliplatin konnte in der CAO/ARO/AIO-04-Studie (Nachfolge-Studie der CAO/ARO/AIO-94-Studie; Studiennummer: NCT 00349076) eine signifikant bessere, histologisch bestätigte Rate an pathologischer Komplettremission (pCR; (y)pT0(y)pM0-Status) im Vergleich zur RCT mit alleiniger Applikation von 5-FU gezeigt werden (17% pCR-Rate im experimentellen Arm mit RCT 5-FU und Oxaliplatin versus 13% pCR-Rate im Kontrollarm RCT mit 5-FU mono; p=0.038; Rödel und Liersch et al. 2012). Jedoch bleibt es abzuwarten, ob sich dieser frühe Surrogatparameter pCR auch auf den Langzeiterfolg gemessen an DFS oder OS auswirken wird.

### 1.3.2 Operative Strategien der Rektumresektion

Die onkologische Rektumchirurgie ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Patienten. Dabei hat neben der angestrebten R0-Resektion auch die partielle oder totale Entfernung des Mesorektums (retrorektaler Fettkörper und das drainierende Lymphknotenabflussgebiet) einen hohen Stellenwert im Hinblick auf die Reduktion von Lokalrezidiven (Arbman et al. 1996; Wibe et al. 2002; Porter 1999; Hermanek et al. 2003). Grundlage für die onkologisch adäquate Rektumresektion stellen dabei Resektionsprinzipien wie die "No-Touch-Technik" während der Präparation sowie die "En-bloc-Resektion" von tumorinfiltrierten Organen dar (Hermanek 1992; Schmiegel et al. 2010).

Während bei Tumoren, die im unteren und mittleren Rektumdrittel lokalisiert sind, eine tiefe anteriore Rektumresektion (TARR) mit einer TME durchgeführt wird, wird bei einem Tumorsitz im oberen Rektumdrittel eine anteriore Rektumresektion (ARR) mit einer PME oder eine TARR mit TME durchgeführt. In der GAST-05-Studie wird derzeit prospektiv geprüft, ob eine PME der TME onkologisch gleichwertig ist.

Eine abdomino-perineale Rektumexstirpation (APE; Entfernung des gesamten Sphinkterapparates) ist bei einem Tumorsitz < 2cm zur Linea dentata oder bei Infiltration der Sphinktermuskulatur erforderlich und umfasst immer eine TME (Becker und Liersch 2006).

Die Qualität der TME wird perioperativ mittels Darstellung und Kanülierung der A. mesenterica inferior und Injektion von ca. 20 ml Methylenblau durch einen gegebenenfalls vorhandenen Farbstoffaustritt beurteilt und unabhängig durch den Pathologen gemäß der Klassifikation des britischen *Medical Research Council* (M.E.R.C.U.R.Y 2002; Hermanek et al. 2003) befundet. Abschließend erfolgt die histopathologische Aufarbeitung des Rektumkarzinomresektates mit Erfassung histopathologischer Parameter (unter anderem Residual-Status, zirkumferenzieller mesorektaler Resektionsrand (CRM), Anzahl der karzinomatös befallenen LK), welche die Basis einer effizienten adjuvanten Therapie darstellt.

### **1.3.3 Adjuvante Systemtherapie**

Nach der aktuellen S3-Leitlinie ist eine adjuvante RCT (mit Applikation von 5-FU) für Patienten mit Tumorsitz in den unteren beiden Rektumdritteln dann indiziert, wenn keine neoadjuvante RCT durchgeführt wurde oder aber wenn eine R1-Resektion vorliegt (Schmiegel et al. 2010). Eine kombinierte RCT senkt die Lokalrezidivrate und verbessert das Gesamtüberleben im Vergleich zu einer alleinigen Operation (Krook et al. 1991; Tveit et al. 1997; Wolmark et al. 2000). Während Patienten mit Tumorlokalisierung in den unteren beiden Rektumdritteln nach erfolgter RCT und Rektumresektion eine adjuvante CTx mit 5-FU oder CTx nach dem FOLFOX-Schema (Applikation von 5-FU, Oxaliplatin und Folinsäure in 12 Zyklen) erhalten, werden Patienten mit Tumorsitz im oberen Drittel nach primärer OP standardmäßig adjuvant mit dem FOLFOX-Regime behandelt.

### **1.4 Konzepte zur Individualisierung der onkologischen Therapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (UICC II/III)**

Patienten mit einem primären cUICC-II/III-Rektumkarzinom sprechen sehr heterogen auf die neoadjuvante RCT an. Dabei reicht das Ansprechen auf die RCT von einer histopathologisch kompletten Remission ("Komplettresponder" in 10-15%) über ein intermediäres Ansprechen („Intermediäre Responder“) bis hin zur Therapieresistenz ("Nonresponder") und zu einer damit einhergehenden verkürzten Langzeitprognose (Liersch et al. 2010; Gaedcke und Liersch et al. 2011).

Die Unterteilung in Responder, Intermediär-Responder und Nonresponder ist notwendig, um eine individualisierte, Rezidivrisiko-adaptierte Therapie für jeden Patienten zu ermöglichen. Patienten, die nach der neoadjuvanten Standard-RCT eine komplette Remission erreichen, dürfen nicht mit den etablierten adjuvanten Systemtherapien übertherapiert werden und in ihrer Lebensqualität auf Grund der therapieassoziierten Toxizität unnötig eingeschränkt werden (Bujko et al. 2010). Intermediär-Responder und Nonresponder dagegen müssen alternativen Therapieregimen zugeführt werden. Beispielsweise durch die Intensivierung der neoadjuvanten Systemtherapie mit einer Kombination von 5-FU und Oxaliplatin wird, wie die ersten Resultate der CAO/ARO/AIO-04-Studie zeigten, eine höhere pCR-Rate erzielt (Rödel und Liersch et al. 2012).

Weiterhin ist die Identifikation von Responsprädiktoren entscheidend, um jeden Patienten mit seinem genetischen Tumorprofil gemäß seinem individuellen Risiko für Resistenz, Therapie-assoziierte Toxizität und Tumorrezidive effektiv zu behandeln. Genexpressions- und Mutationsanalysen an Mitgliedern verschiedener Signaltransduktionswege (MAPK-Signalweg, KRAS) sowie an Proteinen, die im 5-FU-Metabolismus (Thymidylatsynthetase) integriert sind, sind Gegenstand aktueller translationaler Forschung und werden derzeit in prospektiv randomisierten Studien validiert (Kuremsky et al. 2009; Ghadimi et al. 2005; Gaedcke et al. 2010a; Conradi et al. 2011).

### **1.5 Prädiktive und prognostische Marker in der Therapie des Rektumkarzinoms**

Prädiktive Biomarker dienen der Vorhersage des Ansprechens auf therapeutische Interventionen wie beispielsweise auf die neoadjuvante RCT in lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen. Demgegenüber werden mittels prognostischer Biomarker statistische Wahrscheinlichkeiten für das Gesamtüberleben (DFS (lokoregionäre Rezidivraten, Fernmetastasierung) bzw. CSS (Cancer Specific Survival) und OS) beschrieben.

Von prognostischer Relevanz ist die histopathologische, quantitative und qualitative Lymphknotenaufarbeitung und der daraus erhobene LK-Status. Ebenso ist der Residualstatus (Resektionsstatus, R0, R1, R2) ein prognostischer Marker. Ein positiver Nodalstatus oder eine R1- oder R2-Resektion ist mit einem erhöhten Lokalrezidivrisiko sowie reduziertem Gesamtüberleben assoziiert; folglich müssen bei diesen Situationen weitere Therapien (postoperative RCT) angeschlossen werden (Schmiegel et al. 2010; Liersch et al. 2005).

Ein Beispiel für einen prädiktiven Biomarker für eine Anti-EGFR-Therapie (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor), der bereits standardmäßig in der klinischen Routine bei Patienten mit metastasierten KRK etabliert ist, ist der KRAS-Status: Die prätherapeutische Testung von Karzinomgewebe auf eine KRAS-Mutation stellt die Grundvoraussetzung für die Einleitung einer Anti-EGFR-Therapie in Kombination mit CTx in der Therapie metastasierter KRK dar.

KRAS ist Mitglied des MAP-Kinase-Signalweges, welcher in der Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und von Apoptose beteiligt ist (Fang und Richardson 2005). In 35% der KRK kann eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden und stellt eine Kontraindikation für die Applikation des *Biologicals* Cetuximab dar (Gaedcke et al. 2010b). Die KRAS-Mutation korreliert dabei weder mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante RCT noch mit dem Langzeitüberleben; folglich spielt es als Prognosemarker im KRK keine Rolle. In aktuellen Untersuchungen konnte in Zelllinien und in einem *Xenopatiens*-Modell nachgewiesen werden, dass neben der KRAS-Mutation auch eine HER-2-Amplifikation in KRK mit einer Cetuximab-Resistenz assoziiert ist (Yonesaka et al. 2011; Bertotti et al. 2011). Somit ist die Analyse der HER-2-Expression und -Amplifikation im KRK ein interessanter Ansatz, um multimodale personalisierte Therapiestrategien zu entwickeln.

## **1.6 Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2/neu)**

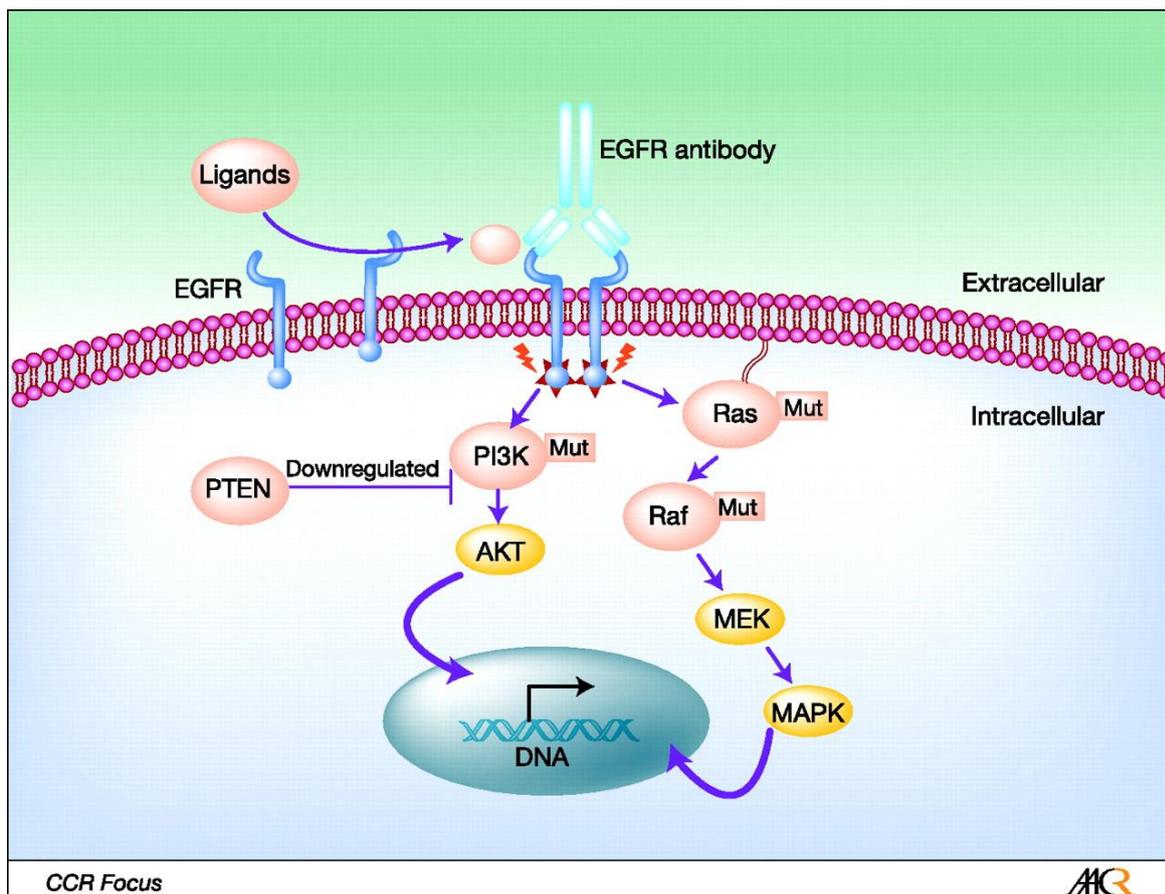
HER-2 oder HER-2/neu, ebenso bekannt unter dem Namen c-erb-B2 (cellular avian erythroblastosis homologue B2), CD 340 (Cluster of differentiation 340) oder P185, gehört zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR 1-4) und wird durch das c-erb-B2-Gen codiert. Das HER-2-Gen ist ein Proto-Onkogen und auf dem menschlichen Chromosom 17 (Chr 17; 17q21-q22) lokalisiert (Coussens et al. 1985).

### **1.6.1 Struktur und Funktion**

HER-2 ist ein membranständiger Rezeptor, bestehend aus einer extrazellulären Ligandenbindenden Domäne, einem lipophilen Transmembransegment und einer intrazellulären Region. Die intrazelluläre Domäne besitzt Tyrosinkinase-Aktivität, die Phosphatgruppen an Tyrosinreste der intrazellulären Effektormoleküle koppelt. Die Aktivierung der EGFR-Rezeptoren 1-4 erfolgt durch extrazelluläre Liganden-induzierte Homo- oder Heterodimerisierung. Mit Ausnahme von HER-2 konnten verschiedene Liganden für die Mitglieder der EGFR-Familie identifiziert werden (Olayioye et al. 2000). HER-2 dimerisiert präferentiell mit dem HER-3-Rezeptor und ist stärker enzymatisch wirksam (Alimandi et al. 1995). Durch die Dimerisierung der Rezeptoren wird die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität stimuliert, sodass spezifische Substrate mit Tyrosinresten autophosphoryliert werden.

Die phosphorylierten Produkte binden an spezifische Signalmoleküle und setzen eine Signalkaskade in Gang. Weitere Signalmoleküle werden rekrutiert und in das Zellinnere geleitet (Signaltransduktion, s. Abbildung 3).

Schließlich wird durch die Aktivierung von HER-2 und die damit verbundene Signaltransduktion das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung stimuliert und der programmierte Zelltod (Apoptose) verhindert (Olayioye et al. 2000).



**Abbildung 3: Signaltransduktionswege von EGFR (Banck und Grothey 2009, S. 7494)**

Die Abbildung zeigt die Signalkaskade der epidermalen Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (EGFR 1-4). EGFR (z.B. HER-2) dimerisiert mit einem weiteren EGFR (präferentiell mit HER-3). Durch Liganden, die extrazellulär an die Rezeptoren binden, erfolgt die Aktivierung der EGFR. Die aktivierte intrinsische Tyrosinkinase phosphoryliert unterschiedliche Substrate (z.B. Phosphoinositolkinasen (PI3K) oder Ras) und setzt eine Signalkaskade in Gang. Weitere Signalmoleküle (AKT, Raf, MEK, MAPK) werden rekrutiert und ins Zellinnere geleitet, sodass schließlich das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung stimuliert werden.

Anti-EGFR-Antikörper (wie z.B. Cetuximab, Panitumumab) können diese Signaltransduktion inhibieren, indem sie extrazellulär an EGFR binden.

### 1.6.2 Tumorbiologische Bedeutung von HER-2

Eine dauerhafte HER-2-Rezeptor-Aktivierung oder eine Überexpression von HER-2-Rezeptoren resultieren in einer Dysregulation der HER-2-induzierten intrazellulären Signalkaskade. Die HER-2-Genamplifikation (Vervielfältigung des HER-2-Gens in mehr als 2 Genkopien) ist der am häufigsten beobachtete Mechanismus, welcher zu einer erhöhten HER-2-Proteinexpression an der Zellmembran führt (Hynes und Stern 1994). In einer normalen Zelle liegt das HER-2-Gen in 2 Genkopien im Zellkern vor und codiert das HER-2-Protein, welches sich nach der Translation in der Zellmembran anlagert.

Die Überexpression des HER-2-Rezeptors (die Vervielfältigung des HER-2-Rezeptors um das 10- bis 100-fache der Norm) stört das kontrollierte Zellwachstum, verhindert die Apoptose und kann unter Umständen zu einer unkontrollierten Zellproliferation und Formation von aggressiven Tumorzellen führen (Hung et al. 1986).

HER-2-Genamplifikation und HER-2-Proteinüberexpression wurden zunächst beim Mammakarzinom nachgewiesen. In 20-30% der Mammakarzinome war ein positiver HER-2-Status nachweisbar, assoziiert mit einem aggressiven Tumorverhalten, erhöhten Rezidivraten, früherer Metastasenbildung und reduzierter Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten ohne HER-2-Überexpression und -Amplifikation (Slamon et al. 1987, 1989; Ross und Fletcher 1998; McCann et al. 1991).

Zudem wurden auch bei Ovarial-, Lungen-, Endometrium-, Cervix Uteri-, Blasen-, Kolon- sowie Magenkarzinomen HER-2-Überexpressionen und -Amplifikationen unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen (Berchuck et al. 1990; Schneider et al. 1989; Weiner et al. 1990; Cirisano und Karlan 1996; Eltze et al. 2005; Schuell et al. 2006; Yano et al. 2006). Der HER-2-Status beim Magenkarzinom und beim Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs (AEG II/III) korreliert mit dem Gesamtüberleben der Patienten ähnlich den Ergebnissen beim Mammakarzinom. Die HER-2-Positivitätsrate liegt bei Magenkarzinomen bei 15-25% (Hofmann et al. 2008; Park et al. 2006; Zhang et al. 2009). Ältere Studien zum Magenkarzinom zeigen auf, dass eine HER-2-Expression und -Genamplifikation mit schlechterer Prognose, aggressiverem Krankheitsverlauf und geringerem Gesamtüberleben einhergehen (Nakajima et al. 1999; Allgayer et al. 2000; Garcia et al. 2003; Tanner M et al. 2005, Park et al. 2006).

Subgruppenanalysen der multizentrischen ToGA-Studie ("Trastuzumab for HER2-positive metastatic Gastric cancer", s. Kapitel 1.6.3), in der nicht mit Trastuzumab-behandelten Kohorte, zeigten für HER-2-positive Patienten ein verbessertes medianes Gesamtüberleben (11.8 Monate versus 8.7 Monate in der HER-2-negativen Subgruppe; n=577; Bang et al. 2010).

### **1.6.3 Klinisch-therapeutische Relevanz des HER-2-Status bei HER-2-positiven Karzinomen**

HER-2 ist als prognostischer Biomarker vor allem beim Mamma- und Magenkarzinom bekannt und stellt einen potentiellen Angriffspunkt einer spezifischen Tumorthherapie dar (*targeted therapy*; Slamon et al. 1989; Gravalos und Jimeno 2008). Zudem scheint HER-2 sich beim Mammakarzinom auch als prädiktiver Biomarker zu eignen, indem er eine erhöhte Sensitivität für bestimmte Therapeutika wie beispielsweise für Anthrazyklin-haltige CTx aufweist (Pritchard et al. 2006; Villman et al. 2006).

Klinisch-therapeutische Relevanz in der Therapie bei HER-2-positiven Karzinomen weist der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) auf. Trastuzumab wurde 1998 von A. Ullrich und M. Shepard (Genentech, San Francisco, USA) entwickelt und 2000 für das metastasierte Mammakarzinom und 2006 für Brustkrebs im Frühstadium von der *Food and Drug Administration* (FDA, Rockville, USA) zugelassen. Der humanisierte Antikörper bindet selektiv an die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors, induziert dadurch einen Zellzyklus-Arrest der Tumorzellen und hemmt die Signaltransduktion durch eine *Downregulation* des HER-2-Gens. Zudem rekrutiert Trastuzumab Immunzellen und hemmt die Angiogenese der Tumorzellen, sodass nachfolgend eine Regression des Tumors erreicht werden kann.

Eine multizentrische Phase-II-Studie zeigte, dass bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom die additive Gabe von Trastuzumab zu einer Standard-CTx (Docetaxel) im Vergleich zur alleinigen CTx-Behandlung das OS signifikant um 8.5 Monate verbessert (Marty et al. 2005). Seit 2010 wurde die Zulassung von Trastuzumab auch für die Behandlung des HER-2-positiven metastasierten Adenokarzinoms des Magens und des gastroösophagealen Übergangs (AEG II/III) erweitert.

In der groß angelegten, kontrollierten und randomisierten ToGA-Studie wurden 584 Patienten mit metastasiertem Magenkarzinom entweder mit Trastuzumab und CTx oder mit alleiniger CTx (Capecitabin + Cisplatin oder 5-FU + Cisplatin) behandelt (Bang et al. 2010). Die Korrelation der Behandlung mit dem Gesamtüberleben ergab, dass Trastuzumab die mediane Überlebenszeit um 2.7 Monate ( $p=0.0046$ ) verbesserte. Es profitierten insbesondere jene Patienten von der Therapie mit Trastuzumab, die hohe HER-2-Level aufwiesen (medianes Überleben der Subgruppe CTx + Trastuzumab von 16.0 Monaten versus 11.8 Monaten bei Behandlung mit CTx; Van Cutsem et al. 2009; Bang et al. 2010).

Zusammenfassend ist die Bestimmung des HER-2-Status somit von größter Bedeutung für die optimale Gabe von Anti-HER-2-Therapien wie Trastuzumab und hat sich bei der Behandlung des Mammakarzinoms neben der operativen Versorgung, Strahlentherapie, CTx und Hormontherapie in der klinischen Routine etabliert.

Die Detektion des HER-2-Status beim metastasierten Magenkarzinom ist im Vergleich zum Mammakarzinom noch am Anfang und wird erst seit kurzem in größeren kontrollierten Studien geprüft (Bang et al. 2010).

#### **1.6.4 Detektionsmethoden des HER-2-Status**

Der HER-2-Status wird durch die Expression des HER-2-Proteins in der Zellmembran und durch die Amplifikationsrate des HER-2-Gens im Zellkern bestimmt. Während die Detektion der Expression des HER-2-Rezeptors mittels immunhistochemischer (IHC) Analysen erfolgt, wird die HER-2-Genamplifikation mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) bestimmt.

Bei den IHC-Analysen werden die zu untersuchenden Tumorproben nach ihren Färbeintensitäten in die Grade 0 (keine Färbung), 1+ (kaum sichtbare Färbung), 2+ (mittelgradig schwache Färbung) und 3+ (starke Färbung) unterteilt. Bei der ISH werden das HER-2-Gen und das Chr 17, auf welchem das HER-2-Gen lokalisiert ist, unter dem Mikroskop als Signalpunkte dargestellt. Mit Hilfe des Verhältnisses der ausgewerteten Anzahl der Chr-17-Signale und der Anzahl der HER-2-Gen-Signale wird eine Ratio ermittelt und der HER-2-Status als 'amplifiziert' (Ratio  $\geq 2.0$ ) oder 'nicht amplifiziert' (Ratio  $< 2.0$ ) diagnostiziert (Rüschoff et al. 2010).

## 1.7 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals an einem großen Patientenkollektiv von Rektumkarzinom-Patienten die Expression des Transmembranrezeptors HER-2 und die Amplifikation des HER-2-Gens. Dabei wurde der HER-2-Status bei Patienten im cUICC-II/-III-Rektumkarzinom unter multimodaler Therapie (s. Abbildung 2 und Kapitel 1.3) erfasst. Erstmals kam in der Methodik der HER-2-Scoring-Algorithmus zur Anwendung, der in der ToGA-Studie beim Magenkarzinom verwendet wurde und sich mittlerweile in der klinischen Routine etabliert hat. Weiterhin wurden sämtliche klinischen Daten (unter anderem prätherapeutische, operative und histopathologische Parameter) und Angaben der Follow-Up-Untersuchungen (mit einem medianen Follow-Up von 46.5 Monaten) von allen Patienten (N=264) erfasst.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Bestimmung der Expressionshäufigkeit und Amplifikation von HER-2 und zum anderen die Korrelation des detektierten HER-2-Status mit kliniko-pathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben. Sollte sich eine HER-2-Überexpression in einem relevanten Anteil der untersuchten prätherapeutischen Biopsien und Rektumkarzinomresektate zeigen, könnte HER-2 möglicherweise ein interessanter Ansatzpunkt für eine *targeted therapy* in der Behandlung des Rektumkarzinoms sein.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die HER-2-Expression und -Genamplifikation in Biopsien?
2. Wie hoch ist die HER-2-Expression und -Genamplifikation in Rektumkarzinomresektaten?
3. Ändert sich der HER-2-Status durch die präoperative RCT?
4. Kann HER-2 ein relevanter prädiktiver Biomarker für eine Multimodaltherapie im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom sein?
5. Hat HER-2 prognostisches Potenzial bezüglich der Korrelation des HER-2-Status mit dem krankheitsfreien oder krankheitsspezifischen Gesamtüberleben?
6. Können die vorliegenden Ergebnisse klinische Auswirkungen auf die Implementierung neuer multimodaler Therapieregime für Patienten mit einem Rektumkarzinom haben?

## 2 Patientenkollektiv, Materialien und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Diese monozentrische Untersuchung umfasst die Analyse von prospektiv ausgewertetem Biomaterial und klinischen Daten von insgesamt 264 Patienten (mittleres Patientenalter: 63 Jahre  $\pm$  10 Jahre; 192 Männer (73%) und 72 Frauen (27%)) mit einem primär lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom. Alle Patienten wurden standardisiert oder analog nach randomisierten Phase-II/-III-Studien der 'German Rectal Cancer Study Group' (GRCSG; CAO/ARO/AIO-94-Studie, XelOX-Studie, CAO/ARO/AIO-04-Studie) behandelt. Die vorliegende Studie wurde im Rahmen des Teilprojektes 5 der Klinischen Forschergruppe 179 (KFO 179-2; [www.kfo179.de](http://www.kfo179.de)) durchgeführt und die Analysen entsprechend dem Antragsvotum im Juni 2006 von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt. Sämtliche Patienten (N=264) wurden im Zeitraum von Juli 1994 bis Dezember 2009 in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie in der Universitätsmedizin Göttingen therapiert.

Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung mit Durchführung der multimodalen Therapie, Biomarkeranalyse und zur Erhebung von Patienten-bezogenen Follow-Up-Daten vor. Daneben beinhalteten Einschlusskriterien für diese Studie neben der informierten Einwilligung das klinisch erfasste (prätherapeutisches Tumorstaging, s. Kapitel 2.2) oder histologisch gesicherte Adenokarzinom des Rektums. Per definitionem lag ein Rektumkarzinom vor, wenn der makroskopisch erkennbare aborale Tumorrand (gemessen mittels starrer Rektoskopie) 16cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt war (Fielding et al. 1991). Die Patienten- und Operationsdaten sowie die Nachsorge- und Untersuchungsbefunde wurden prospektiv in einer Datenbank erfasst und dienten als Grundlage für die Auswertung.

## 2.2 Prätherapeutisches Tumorstaging

Eine umfassende präoperative interdisziplinäre Diagnostik wurde bei allen Patienten durchgeführt und bestimmte die patientenorientierte Entscheidung zwischen einer primär operativen Versorgung, der Einleitung einer neoadjuvanten RCT mit Standard 5-FU oder einer neoadjuvanten, intensivierten RCT mit 5-FU in Kombination mit Oxaliplatin.

Die Stagingprozeduren umfassten eine vollständige Anamnese, die digital-rektale Untersuchung, die starre Rektoskopie, die rektale Endosonographie sowie bei endosonographisch vorgeschrittenen Rektumkarzinomen (uT2) die Kontrastmittel-gestützte Computertomographie (CT) des Abdomens/ Beckens (Gaedcke und Liersch et al. 2011). Bei Verdacht auf einen möglichen Tumorkontakt zur mesorektalen Hüllfaszie wurde eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Pelvis hinzugezogen (Liersch et al. 2005). Die prätherapeutische histopathologische Diagnostik aus den bei der Rektoskopie entnommenen Biopsaten ließ eine sichere Karzinomdiagnose, die Bestimmung der Tumortypklassifikation (Adenokarzinom, Siegelringkarzinom, Plattenepithelkarzinom) und die Bestimmung des Differenzierungsgrads (Grading) der Karzinomzellen zu. Für die vollständige Klassifikation nach UICC und TNM erfolgte die weitere Umfelddiagnostik, welche eine Abdomensonographie, Röntgen-Thorax, Labordiagnostik und CEA-Tumormarkerbestimmung (Carcino-Embryonales-Antigen) umfasste.

## 2.3 Studiendesign

Prätherapeutische, kliniko-pathologische Daten sowie der klinische Langzeitverlauf wurden von sämtlichen Patienten (N=264) erfasst und standen für die Auswertung zur Verfügung (s. Tabelle 4). Nach den Staging-Untersuchungen erhielten 145 Patienten (55%) eine neoadjuvante Radiotherapie (RT) mit 5-FU als Standardtherapie und 72 Patienten (27%) eine intensiviert neoadjuvante RCT mit 5-FU und Oxaliplatin (s. Tabelle 3 und Abbildung 4).

Weitere 47 Patienten (18%) wurden primär operiert und erhielten eine adjuvante RCT mit 5-FU (CAO/ARO/AIO-94-Studie; n=22) oder - im Falle der Tumorlokalisierung im oberen Drittel (12-16 cm) - eine adjuvante CTx mit 5-FU und Oxaliplatin (GAST-05-Studie; n=25). Diese primär operierten Patienten dienten als Kontrollkollektiv für die HER-2-Expressionsanalysen.

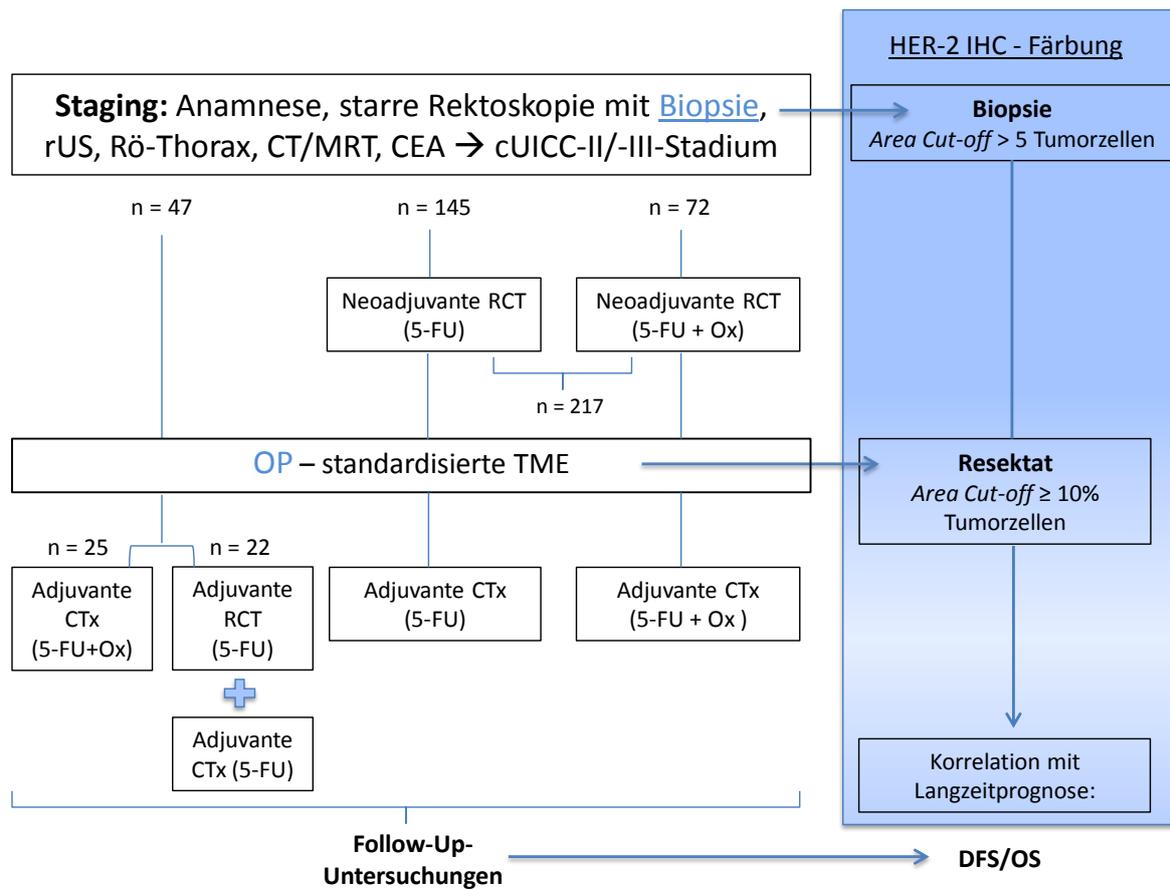
**Tabelle 3: Unterteilung der Patientenkollektive**

| Patientenkollektiv           | A                          |                            | B                           | C  |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| <b>Anzahl</b>                | n=47                       |                            | n=145                       | n=72   |
| <b>präoperative Therapie</b> | primäre Operation          |                            | neoadj. RT und CTx mit 5-FU | (intensivierte) neoadj. RT und CTx mit 5-FU und Ox |
| <b>adjuvante Therapie</b>    | RT und CTx mit 5-FU (n=22) | CTx mit 5-FU und Ox (n=25) | CTx mit 5-FU                | CTx mit 5-FU und Ox                                |
| <b>Studie</b>                | CAO/ARO/AIO-94 (Arm A)     | GAST-05                    | CAO/ARO/AIO-94 (Prüfarm)    | CAO/ARO/AIO-04 (Prüfarm)                           |

Abkürzungen:

neoadj: neoadjuvante; RT: Radiotherapie; CTx: Chemotherapie; 5-FU: 5-Fluorouracil; Ox: Oxaliplatin

Jede Rektumresektion umfasste die Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes, zusammen mit den diesen Darmabschnitt drainierenden LK und mit Ausnahme der randomisierten Patienten der Gast-05-Studie (Arm B) eine standardisierte TME. Die multimodale Behandlung konnte nach 4-6 Wochen mit Applikation adjuvanter CTx (5-FU oder 5-FU und Oxaliplatin) komplettiert werden (Becker und Liersch 2006).



**Abbildung 4: Studiendesign**

Nach dem prätherapeutischen Staging wurden die Patienten entweder primär operiert oder neoadjuvant vorbehandelt (RCT mit 5-FU oder intensivierter RCT mit 5-FU und Ox). Nach standardisierter OP folgte die adjuvante Systemtherapie. Zum Zeitpunkt des Stagings wurden prätherapeutische Tumorbiopsien asserviert und aufgearbeitet; im Rahmen der TME erfolgte die chirurgische Qualitätskontrolle mit Aufbereitung des Resektates sowie die Auswertung. Die Resultate aus den IHC-Auswertungen wurden abschließend mit dem Gesamtüberleben (DFS, CSS) korreliert.

Abkürzungen:

rUS: rektale Endosonographie; CT: Computertomographie; MRT: Magnetresonanztomographie; CEA: Carcino-Embryonales-Antigen; RCT: Radiochemotherapie; 5-FU: 5-Fluorouracil; Ox: Oxaliplatin; TME: Totale mesorektale Exzision; CTx: Chemotherapie; IHC: Immunhistochemie; DFS: Disease Free Survival; OS: Overall Survival

## 2.4 Prätherapeutische Parameter

Die in Abbildung 4 dargestellten Subkollektive wurden nach Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, cT-Status, cN-Status und cUICC-Stadium miteinander verglichen. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied der Kollektive hinsichtlich des Geschlechts ( $p=0.21$ ) sowie des cT-Status ( $p=0.67$ ) nachweisen.

Alle Patientenkollektive wiesen eine ähnliche Altersverteilung (35 – 85 Jahre) auf. Das durchschnittliche Alter (mittleres Patientenalter bei Erstdiagnose: 63 Jahre  $\pm$  10 Jahre) entspricht der normalen Altersverteilungskurve für Patienten mit primärem Rektumkarzinom (Robert Koch Institut 2012).

Das primär operierte Patientenkollektiv ( $n=47$ ) war im Mittel um 5.5 Jahre älter als die nicht mit RCT behandelten Patienten (68 Jahre versus 62.4 Jahre und 62.6 Jahre bei den Kollektiven B und C). Entsprechend der Epidemiologie des Rektumkarzinoms waren in dieser Untersuchung weit häufiger (durchschnittlich 73%) männliche Patienten in dieser Studie zu finden (Robert Koch Institut 2012).

Weiterhin wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom in den cUICC-Stadien II ( $n=82$ ; 31%) und UICC III ( $n=177$ ; 67%) erfasst. Die starre Rektoskopie ergab, dass 97 Tumore (37%) im unteren Rektumdrittel (0-6 cm), 118 (45%) im mittleren (6-12 cm) und 49 Tumore (19%) im oberen Rektumdrittel (12-16 cm) lokalisiert waren.

Eine signifikante Korrelation ( $p<0.001$ ) zeigte sich bei dem Vergleich der Patientenkollektive mit der Tumorlokalisation. Bei 79% ( $n=37$ ) der primär operierten Patienten befand sich der Tumor im oberen Rektumdrittel, zum Teil bedingt durch Patienten aus der GAST-05-Studie (s. Kapitel 2.3). Patienten mit Tumorlokalisation in den unteren beiden Rektumdritteln (94% Kollektiv B; 96% Kollektiv C), die im Rahmen der CAO/AIO/ARO-94- und -04-Studien behandelt wurden, erhielten nach klinischer Vorgabe eine neoadjuvante RCT (s. Tabelle 3).

Hinsichtlich des LK-Status (cN-Status) ergab das präoperative Staging bei 51% der primär operierten Patienten einen Verdacht auf LK-Metastasen. Demnach lag in 49% ein cUICC-III-Stadium im prätherapeutischen Staging vor. In den mit neoadjuvanter RCT behandelten Kollektiven B und C lag der Anteil an cN+-Stadien (UICC-III-Stadium) bei 70% ( $p=0.01$ ).

**Tabelle 4: Patientenkohorten und prätherapeutische Charakteristika (N=264)**

| <u>Therapieregime</u>   | Keine neoadjuvante RCT (Kollektiv A) |    | Neoadjuvante RCT mit Standard-5-FU (Kollektiv B) |    | Neoadjuvante RCT mit 5-FU/Oxaliplatin (Kollektiv C) |    | p-Wert* |
|---|--------------------------------------|----|--|----|---|----|---------|
|   | n=47                                 | %  | n=145  | %  | n=72  | %  |         |
| <b>Präoperative Parameter</b>   |                                      |    |  |    |   |    |         |
| <b>Alter (Jahre)</b>  | 68.0                                 |    | 62.4   |    | 62.6  |    | 0.003   |
| Mittelwert  | 38 - 85                              |    | 35-83  |    | 36-82   |    |         |
| <b>Geschlecht</b>   |                                      |    |  |    |   |    | 0.21    |
| Männlich  | 34                                   | 72 | 111  | 77 | 47  | 65 |         |
| Weiblich  | 13                                   | 28 | 34   | 23 | 25  | 35 |         |
| <b>Tumorlokalisation ab ano (cm)</b>  |                                      |    |  |    |   |    | <0.001  |
| 0-6 cm  | 3                                    | 6  | 64   | 44 | 30  | 42 |         |
| >6-12 cm  | 7                                    | 15 | 72   | 50 | 39  | 54 |         |
| >12-16 cm   | 37                                   | 79 | 9  | 6  | 3   | 4  |         |
| <b>cT-Status</b>  |                                      |    |  |    |   |    | 0.67    |
| 2   | 1                                    | 2  | 5  | 3  | 2   | 3  |         |
| 3   | 44                                   | 94 | 126  | 87 | 66  | 92 |         |
| 4   | 2                                    | 4  | 14   | 10 | 4   | 6  |         |
| <b>cN-Status</b>  |                                      |    |  |    |   |    | 0.01    |
| Positiv   | 24                                   | 51 | 104  | 72 | 52  | 72 |         |
| Negativ   | 23                                   | 49 | 41   | 28 | 20  | 28 |         |
| <b>cUICC-Stadium</b>  |                                      |    |  |    |   |    | 0.05    |
| II  | 23                                   | 49 | 41   | 28 | 18  | 25 |         |
| III   | 23                                   | 49 | 102  | 70 | 52  | 72 |         |
| IV  | 1                                    | 2  | 2  | 1  | 2   | 3  |         |
| * p-Wert Berechnung mit Chi-Quadrat-Test; für die Altersdifferenz wurde der Kruskal-Wallis-Rank-Test angewendet |                                      |    |  |    |   |    |         |

## 2.5 Materialien

Insgesamt wurden 169 Gewebeproben aus prätherapeutischen Biopsien zum Zeitpunkt der Staging-Untersuchungen (s. Kapitel 2.2) und 225 Gewebeproben des resezierten Rektumkarzinoms immunhistochemisch analysiert (s. Abbildung 4). Von diesen in Paraffin eingebetteten und in Formalin fixierten Proben wurden 81 Gewebeschnitte der Biopsien und 175 Gewebeschnitte der Rektumkarzinomresektate mittels Dual-ISH gefärbt und ausgewertet.

Weiterhin konnten 130 der 169 immunhistochemisch gefärbten prätherapeutischen Biopsie-Präparate den korrespondierenden Resektat-Präparaten des jeweiligen Patienten zugeordnet werden. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich des HER-2-Status aus der Biopsie mit dem HER-2-Status aus dem korrespondierenden Rektumkarzinomresektat.

Nach erfolgter präoperativer RCT wurde in 17 Rektumresektat-Präparaten eine komplette RCT-induzierte Tumorregression diagnostiziert. In weiteren 22 Fällen, welche exzellent auf die neoadjuvanten Therapie (TRG 3b) angesprochen hatten, waren in dem vorliegenden Resektat-Präparat zu wenige Karzinomzellen für weitere HER-2-Analysen vorhanden (s. Abbildung 4).

## 2.6 Perioperative Qualitätssicherung, histopathologische Aufbereitung und Beurteilung des residuellen Tumorgewebes

Nach erfolgter Rektumresektion wurde das native Resektat gemäß etablierter Richtlinien beurteilt (Hermanek et al. 2003):

Dabei umfasste die Qualitätssicherung die Darstellung und Kanülierung der A. mesenterica inferior mit Injektion von ca. 20 ml Methylenblau zur Anfärbung des mesorektalen Weichgewebes und die Dokumentation des Farbaustritts mit Unterscheidung zwischen keinem Farbaustritt (komplette TME), punktförmigem (mikroskopisch unvollständige TME) und flächenhaftem Farbaustritt (makroskopisch unvollständige TME; Liersch et al. 2005). Anschließend wurde das native Rektumresektat dem Pathologen übergeben, der zusätzlich die Qualität des Präparates entsprechend der Klassifikation des britischen *Medical Research Council* M.E.R.C.U.R.Y. (2002) beurteilte.

Die Aufarbeitung des Rektumresektates umfasste folgende Aspekte (Liersch et al. 2005):

1. Makroskopische Beurteilung und Befunderhebung:

- Ausmessen der Länge des Resektates und des maximalen longitudinalen sowie transversalen Durchmessers des Tumors
- Dokumentation der Wuchsform (polypoid-gestielt, -tailliert, -sessil, plattenartig, ulzerös, szirrhös)
- Dokumentation der Lage des Tumors zur peritonealen Umschlagsfalte, etwaigen Tumorperforationen und Läsionen (vor allem Polypen)
- Vermessung des Abstandes des Tumorrandes von der aboralen Resektionslinie (ohne Zug und ohne Ausspannen)

2. Eröffnen des Resektates oberhalb und unterhalb des Tumors ohne Durchschneidung des Karzinoms

3. Aufspannen des Resektates auf eine Korkplatte (ohne Zug) und anschließende Formalinfixierung des Präparates

4. Makroskopische und mikroskopische Untersuchung des CRM (Abstand des Tumorrandes zum Resektionsrand), sowie Bestimmung des oralen und aboralen Resektionsrandes an Hand relevanter Präparatschnitte (lamellierende Querschnitte durch den Tumor und das umgebende mesorektale Gewebe)

5. Untersuchung und Präparation der Arterien und von mind. 12 regionären mesorektalen LK

Folgende histopathologische Parameter waren für eine Prognoseabschätzung sowie für eine adäquate Therapieempfehlung (z.B. nachstehende adjuvante Systemtherapie) von Relevanz. Sie wurden nach den TNM-/ UICC-Richtlinien sowie nach der S3-Leitlinie erhoben (Schmiegel et al. 2010):

- Lokalisation des Karzinoms
- Tumortyp nach WHO-Klassifikation und Tumorinvasionstiefe (pT-Status)
- Anzahl und Status der untersuchten regionären mesorektalen LK (pN-Status)
- Differenzierungsgrad des Tumors (Grading 0-4)
- Zirkumferenzieller, oraler und aboraler Resektionsrand
- Residualstatus (R-Klassifikation; wird in der vorliegenden Arbeit dem Resektionsstatus begrifflich gleichgesetzt)

## 2.7 Histopathologische Beurteilung nach neoadjuvanter Radiochemotherapie

Die neoadjuvante RCT ist auf Grund der exzellenten Studienergebnisse der CAO/ARO/AIO-94-Studie (signifikante Senkung der Lokalrezidivrate; Sauer et al. 2004) zur prätherapeutischen Standardbehandlung beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (UICC-Stadium-II und -III) geworden. Der histopathologisch am frühesten zu bestimmende Parameter für ein Ansprechen des Malignoms auf die RCT ist der Tumorregressionsgrad (TRG; sogenannter „early surrogat marker“; Dworak et al. 1997; Gavioli et al. 2000). Die Klassifikation der Tumorregression erfolgt in 5 Stufen (s. Tabelle 5; TRG 0-4).

**Tabelle 5: Tumorregressionsgrad (Dworak et al. 1997, modifiziert nach Becker und Liersch 2006, S. 619)**

|       |  |
|-------|--|
| TRG 0 | Keine Regression   |
| TRG 1 | Minimale Regression; <25% der Tumormasse mit Zeichen radiogener Fibrose und Vaskulopathie  |
| TRG 2 | Moderate Regression bei 25-50% der Tumormasse; radiogene fibrotische Veränderung dominieren, leicht zu findende Tumorzellnester                              |
| TRG 3 | Gute Regression bei >50% der Tumormasse; nur vereinzelte, mikroskopisch schwer zu entdeckende Tumorzellen in dominierend fibrotischem Gewebe und Schleimseen |
| TRG 4 | Komplette Regression; keine Tumorzellen, nur fibrotisches Gewebe   |

Für die weitere Beurteilung des Tumoransprechens nach neoadjuvanter RCT wird neben der Befundung des TRG auch das T-Level-Downsizing (Verringerung des T-Status um  $\geq 1$  Level) und das UICC-Downstaging (Verkleinerung des UICC-Stadiums um  $\geq 1$  Level) erfasst. Dazu wurde jeweils der im Staging ermittelte cT-Status und das cUICC-Stadium mit den postoperativen, histopathologischen Befunden (y)pT-Status und (y)pUICC-Stadium verglichen.

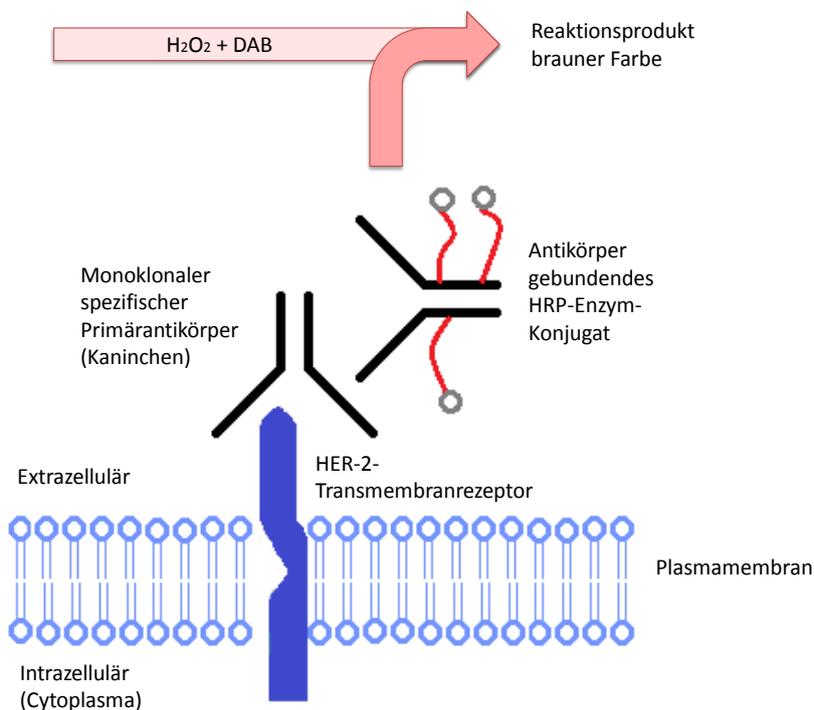
## 2.8 Immunhistochemische Analysen

Die immunhistochemische Gewebefärbung dient zur Identifizierung und Klassifizierung von Zellen, die bestimmte Antigene exprimieren. Bei diesem Verfahren bedient man sich der Eigenschaft, dass spezielle Antikörper spezifisch an Antigensequenzen (Epitope) binden.

Mit Hilfe von Detektionskomponenten, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind, wird das Signal der Antigen-Antikörper-Reaktion farblich hervorgehoben und kann im Lichtmikroskop dargestellt werden (indirekte Zwei-Schritt-Methode; Boenisch et al. 2006).

Der verwendete Primärantikörper ist ein von der Firma Ventana (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) entwickelter monoklonaler Kaninchen-Antikörper, der spezifisch in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten an die interne extrazelluläre Domäne des transmembranen Rezeptors HER-2 bindet.

In einem zweiten Schritt wird durch die Zugabe eines Detektionssystems der Primärkomplex lokalisiert. Das Detektionssystem ist Multimer-basiert und besteht aus einem Sekundärantikörper, einem Horseradish-Peroxidase-Enzym-Konjugat (HRP), dem Chromogen DAB (Diaminobenzidin) und dem Substrat Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Der Sekundärantikörper weist eine hohe Antikörper-Spezifität, sowie eine hohe Sensitivität auf, sodass selbst kleine Mengen des Primärantikörpers detektiert werden können. Durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase wird das Substrat  $H_2O_2$  oxidiert und das zunächst farblose DAB zu einem Reaktionsprodukt brauner Farbe ausgefällt (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Modell der IHC-HER-2-Gewebefärbung**

Die extrazelluläre Domäne des HER-2-Transmembranrezeptors ist Angriffspunkt für den monoklonalen Kaninchenantikörper. An den spezifischen Primärantikörper bindet der Sekundärantikörper und mittels des

gebundenen HRP-Enzym-Konjugats werden die Substrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DAB zu einem Reaktionsprodukt brauner Farbe ausgefällt.

### 2.8.1 Schnittanfertigung

Die immunhistochemische Färbung umfasste die Aufarbeitung von insgesamt 394 Gewebeblöcken. Diese beinhalteten 169 Gewebeblöcke von prätherapeutischen Biopsien und 225 Blöcke mit Karzinomgewebe des resezierten Tumors (s. Abbildung 4). Zunächst wurden die über 24 Stunden in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Blöcke mit Hilfe des Schlittenmikrotoms (Microm HM 430, MICROM International, Walldorf, Deutschland) in einer Stärke von 2µm geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf Glasobjektträger (Engelbrecht, Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) aufgebracht, in einem Wasserbad bei Raumtemperatur und auf einer Heizplatte gestreckt und abschließend über Nacht zum Trocknen in einem Wärmeschrank bei 40°Celsius (C) aufbewahrt.

### 2.8.2 Färbeprotokoll

Für die Färbungen wurde der Färbeautomat Ventana IHC - BENCHMARK XT System (Ventana, Tucson, Arizona, USA) eingesetzt. Die Verwendung eines standardisierten Färbeautomaten reduziert die Möglichkeit menschlicher Fehler und die inhärente Variabilität. Das Färbeprotokoll umfasste die Entparaffinierung der Gewebeschnitte, die Zellaufbereitung (Antigendemaskierung) mit einem *Cell-Conditioner* und Zugabe des monoklonalen Kaninchen-Primärantikörpers (PATHWAY® anti-HER-2/*neu* (4B5), Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Nach Inkubation des Primärantikörpers für 32 Minuten (Min) bei 37°C wurden die Detektionskomponenten (*ultraVIEW* Universal Detection Kit, Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin für 12 Min und das *Bluing* für weitere 4 Min.

Nach Beendigung des Färbeprogramms wurden die Objektträger mit Wasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe mit Xylol entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Vitro Clud (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

### 2.8.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der IHC-Gewebeschnitte erfolgte entsprechend dem in der ToGA-Studie eingesetzten Scoring-System, das eine suffiziente Auswertung von Gewebeschnitten beim Magenkarzinom ermöglichte (Bang et al. 2010; s. Abbildung 7). Zur Auswertung des HER-2-Status im Magenkarzinom wird ein modifizierter Auswertealgorithmus verwendet (Rüschoff et al. 2010), der sich von der Routinediagnostik beim Mammakarzinom unterscheidet. Bei Mammakarzinomen setzt der etablierte HER-2-Testalgorithmus voraus, dass das Ausmaß der IHC-Färbung bei der Biopsie sowie beim Resektat jeweils  $\geq 10\%$  der Karzinomzellen entspricht. Weiterhin wird die Zirkularität der Membranfärbung für einen positiven HER-2-Status gefordert. Die IHC und FISH (Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung) werden als Detektionsmethoden des HER-2-Status als gleichwertig betrachtet (s. Tabelle 6).

Diese Kriterien wurden zur Auswertung von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (zunächst Magenkarzinom und auch Karzinom des gastroösophagealen Übergangs) wie im Folgenden dargelegt modifiziert und in der ToGA-Studie angewandt:

#### 1. Ausmaß ("Area Cut-Off")

Aufgrund der Heterogenität in Tumorarealen beim Magenkarzinom werden zur Detektion des HER-2-Status 5 gefärbte, kohäsive Tumorzellen in bioptisch gewonnenen Tumorproben benötigt. Mindestens 10% der im Resektat gewonnenen Karzinomzellen mit einer positiven Membranfärbung sind für eine adäquate Auswertung erforderlich.

#### 2. Spezifische Membranfärbung

Tumorzellen werden als immunhistochemisch positiv angefärbt gewertet, wenn sie eine eindeutig erkennbare strichförmige interzelluläre Membranreaktion an den Zell-Zell-Kontakten aufweisen (Rüschoff et al. 2010). Die Zirkularität der Membranfärbung ist keine Voraussetzung für einen positiven HER-2-Status. Aufgrund fehlender luminal gelegener Rezeptoren in intestinalen Drüsen sind basolaterale oder laterale Membranfärbungen ebenfalls auswertbar.

Zytoplasmatische, nukleäre, nur basale, luminale oder granuläre Färbungen, die unter anderem bei intestinalen Metaplasien vorkommen können, werden nicht berücksichtigt (s. Abbildung 8).

**Tabelle 6: HER-2-Diagnostik beim Mamma-, Magen- und Rektumkarzinom (modifiziert nach Rüschoff et al. 2010, S. 305)**

|                           | Mammakarzinom   | Magenkarzinom   | Rektumkarzinom   |
|---------------------------|---|---|--|
| <b>IHC-Färbung</b>        |   |   |  |
| Ausmaß<br>(Area Cut-off)  | Resektat und Biopsie<br>jeweils $\geq 10\%$                   | Biopsien $\geq 5$ Tumorzellen<br>Resektat $\geq 10\%$<br>Tumorzellen          | Biopsien $\geq 5$ Tumorzellen<br>Resektat $\geq 10\%$<br>Tumorzellen                     |
| Membranfärbung            | Zirkularität Voraussetzung<br>für IHC 2+/3+                   | Meist inkomplett<br>(basolateral oder lateral)                                | Meist inkomplett<br>(basolateral oder lateral)   |
| <b>Patientenselektion</b> |   |   |  |
| Dual-ISH/FISH vs. IHC     | FISH und IHC gleichwertig<br>FISH positiv ab Ratio $\geq 2.0$ | IHC als Primärtest<br>FISH nur bei IHC 2+<br>FISH positiv ab Ratio $\geq 2.0$ | IHC als Primärtest<br>Dual-ISH nur bei IHC 2+<br>Dual-ISH positiv<br>ab Ratio $\geq 2.0$ |

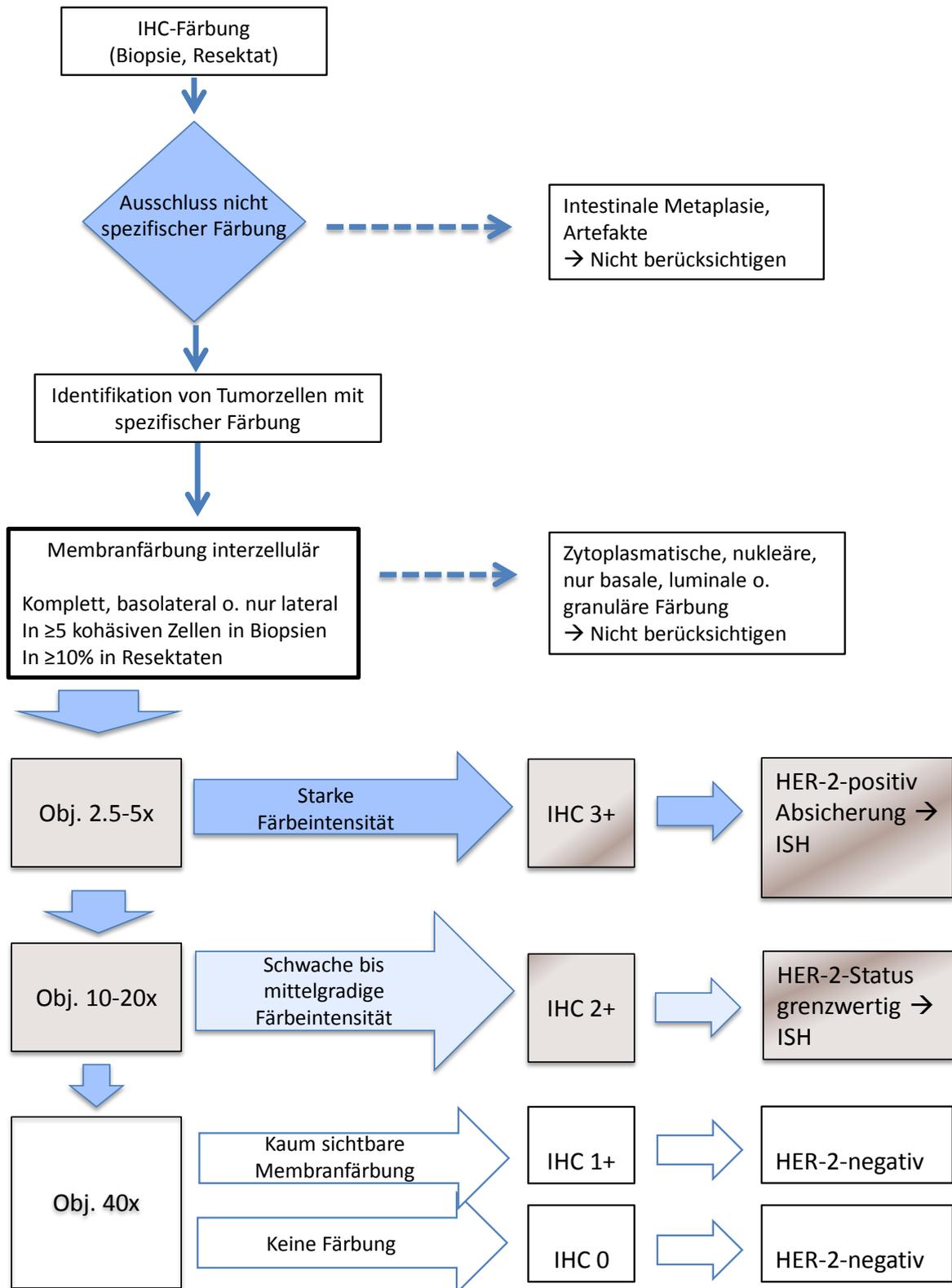
Wichtigstes Auswertungskriterium ist die von Rüschoff et al. (2010) entwickelte "Objektivregel" bzw. "Vergrößerungsregel", welche ein objektives und standardisiertes Arbeiten ermöglicht. Die "Objektivregel" unterteilt die gefärbten Gewebeschnitte nach ihrer Farbeintensität in Bezug auf bestimmte Vergrößerungsfaktoren im Lichtmikroskop (s. Abbildung 6):

1. Zunächst wird das Adenokarzinom in der Probe identifiziert. Zellen in Tumorschnitten mit intestinaler Metaplasie sind häufig ebenfalls stark braun membranös gefärbt und dürfen nicht als Tumorzellen mit starker Färbung verwechselt werden; sie sind demnach zu verwerfen.
2. Tumorschnitte sind als IHC 3+ zu werten, wenn mindestens 5 prätherapeutische Tumorzellen bzw. mindestens 10% der Tumorzellen aus dem Resektat eine starke Färbung im Lichtmikroskop unter einer Vergrößerung von 2.5x oder 5x aufweisen (s. Abbildung 6). Bei unsicherer Beurteilung der Färbung bei 5-facher Vergrößerung ist eine anschließende ISH durchzuführen. Ist die Membranfärbung erst bei einer Vergrößerung von 10x bis 20x schwach bis mittelgradig beurteilbar, wird der Tumorschnitt als IHC 2+ klassifiziert. Aufgrund durchgeführter Analysen ist bekannt, dass IHC 0 und IHC 1+ mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht amplifiziert sind (Ridolfi et al. 2000).

Der HER-2-Genstatus der IHC 2+ gefärbten Schnitte wird als grenzwertig positiv betrachtet, sodass zusätzlich bei allen IHC 2+ klassifizierten Tumorschnitten eine ISH durchgeführt wird. Wird eine Ratio von  $\geq 2.0$  bestimmt, ist die ISH tatsächlich positiv; eine Ratio  $< 2.0$  wird entsprechend als ISH-negativ gewertet. Ist die immunhistochemische Membranfärbung erst bei 40-facher Vergrößerung beurteilbar und sehr schwach bzw. kaum sichtbar, ist der Tumorschnitt als IHC 1+ zu werten.

Keine Reaktivität oder eine sehr schwache Membranfärbung in  $< 5$  Tumorzellen in der Biopsie und  $< 10\%$  der Tumorzellen im Resektat werden IHC 0 klassifiziert.

Zusammenfassend gilt der HER-2-Status als positiv, wenn das Präparat IHC 3+ oder IHC 2+/ISH-positiv klassifiziert wurde. IHC 0, IHC 1+ oder IHC 2+/ISH-negativ werden als HER-2-negativ diagnostiziert.



**Abbildung 6: HER-2-IHC-Testalgorithmus beim Magen- und Rektumkarzinom**

Zunächst wird der Gewebeschnitt der Biopsie bzw. des Resektates mittels IHC gefärbt. Nach Ausschluss unspezifischer Färbungen wie Artefakte oder intestinale Metaplasie, muss die Membranfärbung der Karzinomzellen beurteilt werden. Komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung sind adäquat auswertbar, während zytoplasmatische, nukleäre, basale, luminal oder granuläre Membranfärbungen nicht

berücksichtigt werden. Mittels der "Objektivregel" werden die Gewebeschnitte nach ihren Färbeintensitäten in den Vergrößerungsschritten 2.5-5x, 10-20x und 40x in die jeweiligen IHC-Grade 0 bis 3+ eingeteilt.

**IHC - Score**



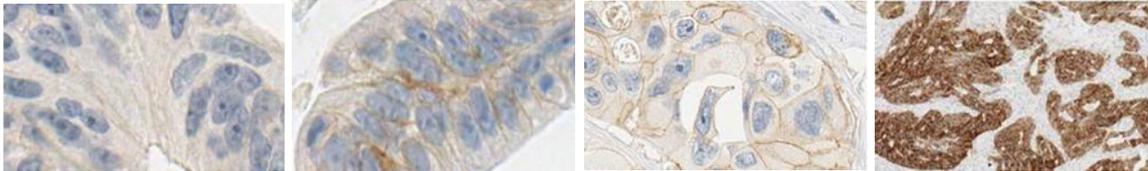
**Färbeintensität**

keine Reaktivität\*\*  
(Obj. 40x)

kaum sichtbar\*  
(Obj. 40x)

schwach bis mittelgradig\*  
(Obj. 10-20x)

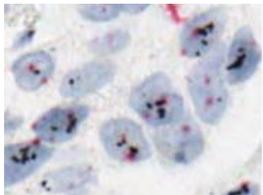
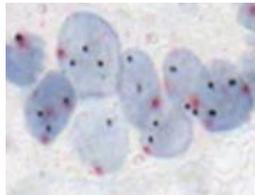
stark\*  
(Obj. 2.5-5x)



Dual-ISH

Ratio < 2.0  
= Dual-ISH negativ

Ratio ≥ 2.0  
= Dual-ISH positiv



HER-2-Status

negativ

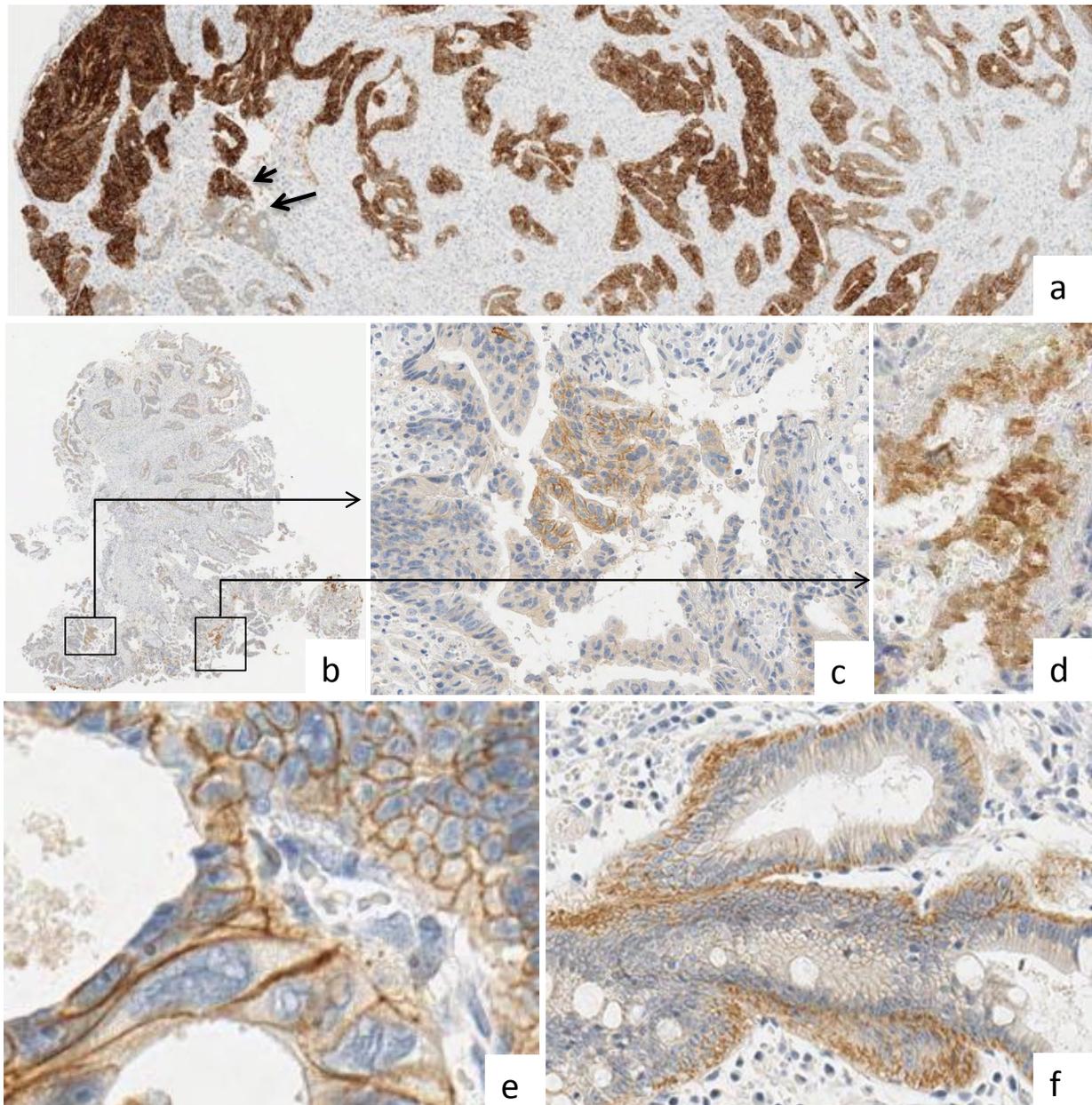
positiv

**Abbildung 7: HER-2-Scoring beim Rektumkarzinom**

Die Abbildung zeigt das HER-2-Scoring mittels der "Objektivregel". Die als IHC 2+ bewerteten Schnitte werden mittels Dual-ISH in 'amplifiziert' und 'nicht amplifiziert' unterteilt. Der HER-2-Status ist positiv, wenn der Schnitt als IHC 3+ oder IHC 2+/Dual-ISH-positiv beurteilt wird. Es liegt ein negativer HER-2-Status vor, wenn der Schnitt als IHC 0, IHC 1+ oder IHC 2+/Dual-ISH-negativ gewertet wird.

\*\*oder sehr schwache Membranfärbung in < 5 Tumorzellen in der Biopsie bzw. < 10% Tumorzellen im Resektat

\* in ≥ 5 Tumorzellen der Biopsie bzw. ≥ 10% der Tumorzellen im Resektat



**Abbildung 8: HER-2-Diagnostik beim Rektumkarzinom (a-f)**

- a:** Heterogene HER-2-Positivität im Resektat (5x); keine Färbung (IHC 0) und kräftige HER-2-Überexpression (IHC 3+) direkt benachbart (s. Pfeilspitzen)
- b-d:** Korrespondierende Biopsie des Resektates **a**: Heterogene HER-2-Positivität in der Biopsie; **c**: 20x, fokale HER-2-Expression (IHC 2+) in der Bildmitte; unspezifische Färbung/ Artefakt im gleichen Biopsiepräparat (**d**, 20x)
- e:** Basolaterale, laterale (teilweise ringförmige) interzelluläre Membranfärbung im Resektat (20x); IHC 2+
- f:** Die intestinale Metaplasie (20x) zeigt mittelgradig starke Färbung auf; aufgrund des fehlenden Nachweises eines Adenokarzinoms ist die Färbung somit nicht zu berücksichtigen.

## 2.9 Dual-in-situ-Hybridisierung

Die ISH ist eine molekularbiologische Methode zum spezifischen und direkten Nachweis von Nukleinsäuren (DNA und RNA) im histologischen Schnittpräparat ("in-situ"). Markierte Sonden hybridisieren bzw. binden an spezifische DNA- oder RNA-Sequenzen in Chromosomen und lokalisieren das zu bestimmende Gen, DNA-Sequenzen oder Chromosomen. Die verwendeten Sonden können mit Fluoreszenz-Farbstoffen, radioaktiven Nukleotiden oder mit weiteren Substanzen markiert sein.

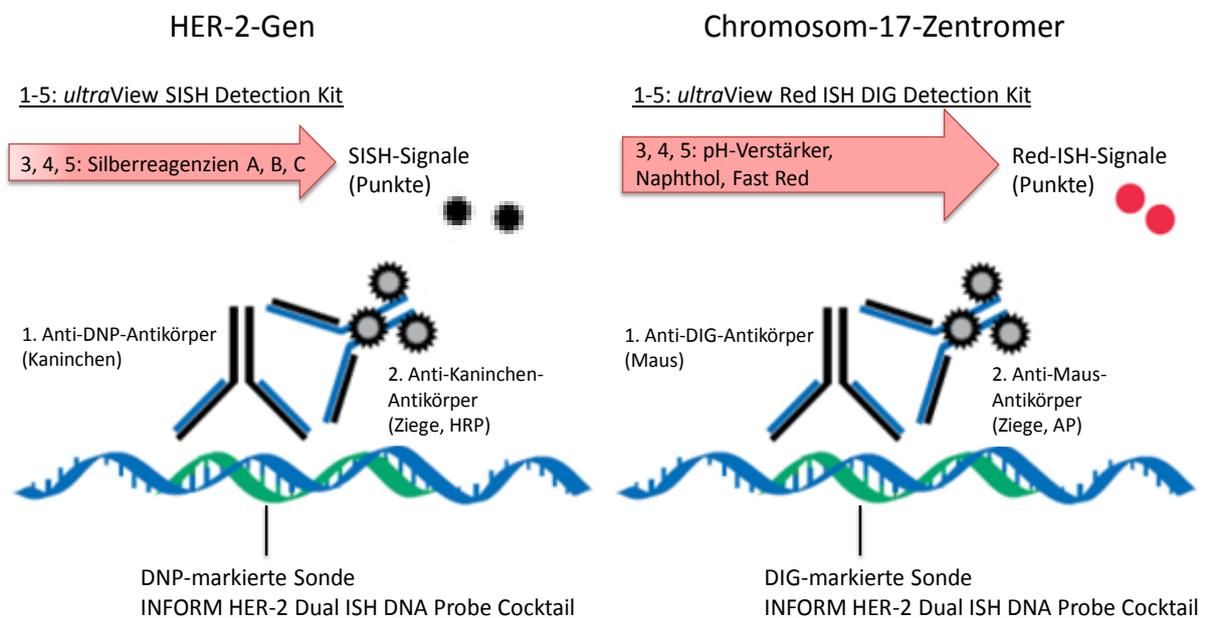
Mit Hilfe spezifischer Detektionskomponenten, welche an die markierten Sonden binden, lässt sich das zu untersuchende Signal im Lichtmikroskop (Silber-ISH mit Dinitrophenyl (DNP)-markierter Sonde) oder im Fluoreszenz-Mikroskop (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) darstellen.

In der ToGA-Studie an Magenkarzinomen erfolgte die Detektion des HER-2-Genstatus mittels FISH. Es konnte gezeigt werden, dass eine ISH unter Verwendung eines Lichtmikroskops (beispielsweise Dual-ISH) der fluoreszenzbasierten Technik überlegen ist (Rüschoff et al. 2010). Im Magenkarzinom wie auch im Rektumkarzinom ist die HER-2-Expression sehr heterogen. HER-2 exprimierende und nicht-exprimierende Tumorzellen liegen direkt benachbart. Bei der Bewertung der Genamplifikation mittels ISH erfordert dies ein präzises Abgleichen der amplifizierten und nicht amplifizierten Tumorareale. Eine gezielte Zuordnung zwischen IHC und ISH ist bei einer lichtmikroskopischen Darstellung mit einem Standard Lichtmikroskop in 20-, 40-, und/ oder 60-facher Vergrößerung besser möglich als mit der fluoreszenzbasierten Methode, bei der mit starker Vergrößerung (100:1) gearbeitet wird.

In dieser Arbeit wurde für die quantitative Bestimmung der Amplifikation des HER-2-Gens eine lichtmikroskopische Darstellung des HER-2-Gens und des Chr-17-Zentromers mittels einer Zweifarb-ISH gewählt (Silber-ISH und Red-ISH). Das HER-2-Gen wurde durch eine DNP-markierte Sonde (INFORM HER-2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, Ventana Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) lokalisiert und durch das Detektionssystem VENTANA *ultraView* Silber ISH DNP Detection Kit (Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) visualisiert.

Die Detektion des Chr-17-Zentromers erfolgte mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde und die Visualisierung mit VENTANA *ultraView* Red ISH DIG Detektion Kit (Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Durch die verwendeten Detektionssysteme stellte sich lichtmikroskopisch das HER-2-Gen als isoliert schwarzes Signal (S-ISH) und das Chr 17 als rot leuchtendes Signal (Red-ISH) dar (s. Abbildung 9).

Der HER-2-Genstatus wurde ermittelt durch die Auszählung der mittels Dual-ISH sichtbar gemachten Kopien des HER-2-Gens und der mittels chromogener Red-ISH sichtbar gemachten Kopien von Chr 17 (s. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Modell der Dual-ISH-Färbungen (modifiziert nach Grogan et al. 2010; S. 2)**

Der INFORM HER-2 Dual ISH DNA Probe Cocktail enthält zwei Sonden (DNP- und DIG-markiert), die im ersten Schritt die entsprechenden Genabschnitte (HER-2-Gen und Chr-17-Zentromer) markieren. In einem zweiten Schritt wird zur Lokalisation der Sonde ein Detektions-Kit aufgebracht:

**HER-2-Gen:** Das *ultraView* SISH Detection Kit beinhaltet einen Anti-DNP-Kaninchen-Antikörper, welcher an die DNP-markierte Sonde bindet. An diesen Antikörper bindet ein weiterer Anti-Kaninchen-Antikörper und enthält zudem ein HRP-Enzym-Konjugat (Horseradish Peroxidase). HRP reagiert mit den Silberreagenzien zu isolierten schwarzen Signalen, welche sich lichtmikroskopisch darstellen lassen.

**Chr-17-Zentromer:** Das *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit beinhaltet einen Anti-DIG-Maus-Antikörper, welcher an die DIG-markierte Sonde bindet. An diesen Antikörper koppelt ein Anti-Maus-Antikörper und enthält weiterhin Alkalische Phosphatase (AP). AP reagiert mit Naphthol, Fast Red und weiteren pH-Verstärkern zu einem roten Signal.

### 2.9.1 Färbeprotokoll der Dual-ISH

Nach Anfertigung der Gewebeschnitte (s. Kapitel 2.8.1) wurden die Dual-ISH-Färbungen unter standardisierten Bedingungen mit dem Färbeautomaten Ventana IHC - BENCHMARK XT System (Ventana, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit Hilfe eines voll-automatisierten Färbeprotokolls:

In einem ersten Schritt wurden die Tumorschnitte durch die Antigendemaskierung mittels Citrat und einer Protease für die weitere Behandlung vorbereitet. Die DNP- bzw. DIG-markierte Sonde (INFORM HER-2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde in einem weiteren Schritt aufgetragen und koppelte nach Denaturierung der DNA-Stränge spezifisch an Chr 17 und an das HER-2-Gen. Nach Inkubation der Detektionssysteme *ultraView* SISH Detektion Kit (Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 20 Min und *ultraView* Red ISH DIG Detection Kit (Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 32 Min, erfolgte in einem letzten Schritt die Kernfärbung mit Hämatoxylin für 8 Min und das *Bluing* für weitere 4 Min.

Nach Beendigung des Färbeprogramms wurden die Objektträger mit Wasser und Aqua bidest gespült und in aufsteigender Alkoholreihe mit Xylol entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Vitro Clud (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

### 2.9.2 Auswertung der Dual-ISH-Färbungen

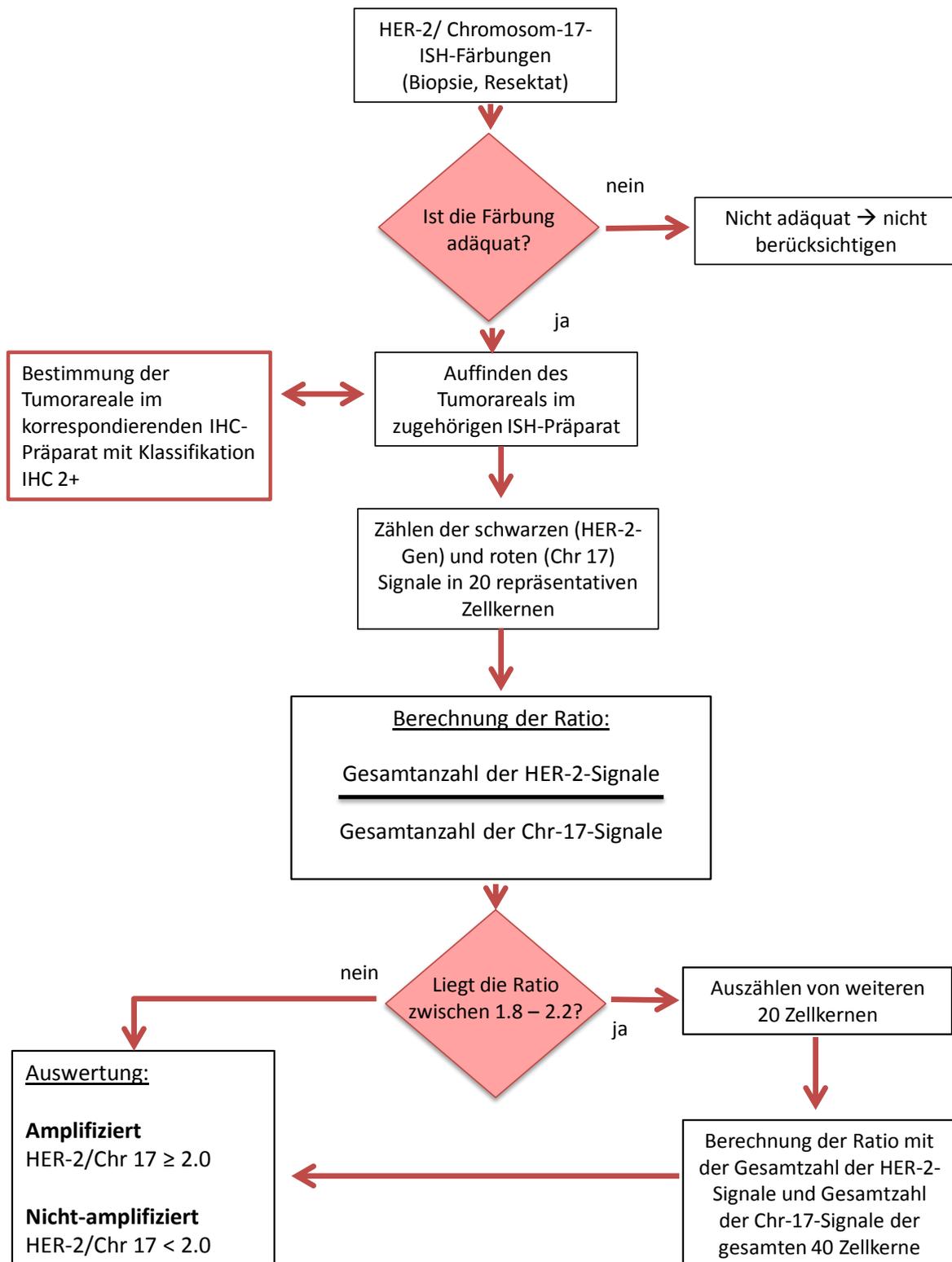
Die Auswertung der ISH-Färbungen beim Rektumkarzinom erfolgte ebenfalls wie die immunhistochemischen Auswertungen analog zu den bekannten Kriterien beim Mamma- und Magenkarzinom.

Der HER-2-Genstatus wurde durch die Berechnung der Ratio aus dem Quotienten der Summe der Gen-spezifischen (schwarzen) Signale und der Summe aller Chr-17-spezifischen (roten) Signale in den Zellkernen des invasiven Rektumkarzinoms bestimmt. Zur Berechnung der Ratio wurde ein geeigneter Zielbereich gewählt und 20 kohäsiv repräsentative, auswertbare Zellen sowie die enthaltenen Signale in den Zellkernen gezählt.

Lag das Ergebnis nach der Berechnung des HER-2/Chr-17-Verhältnisses bei 1.8 - 2.2, mussten weitere 20 Zellen ausgezählt werden. Bei einer Ratio von  $\geq 2.0$  wurde der HER-2-Genstatus als amplifiziert diagnostiziert, analog dazu wieder bei einer Ratio von  $< 2.0$  als nicht amplifiziert.

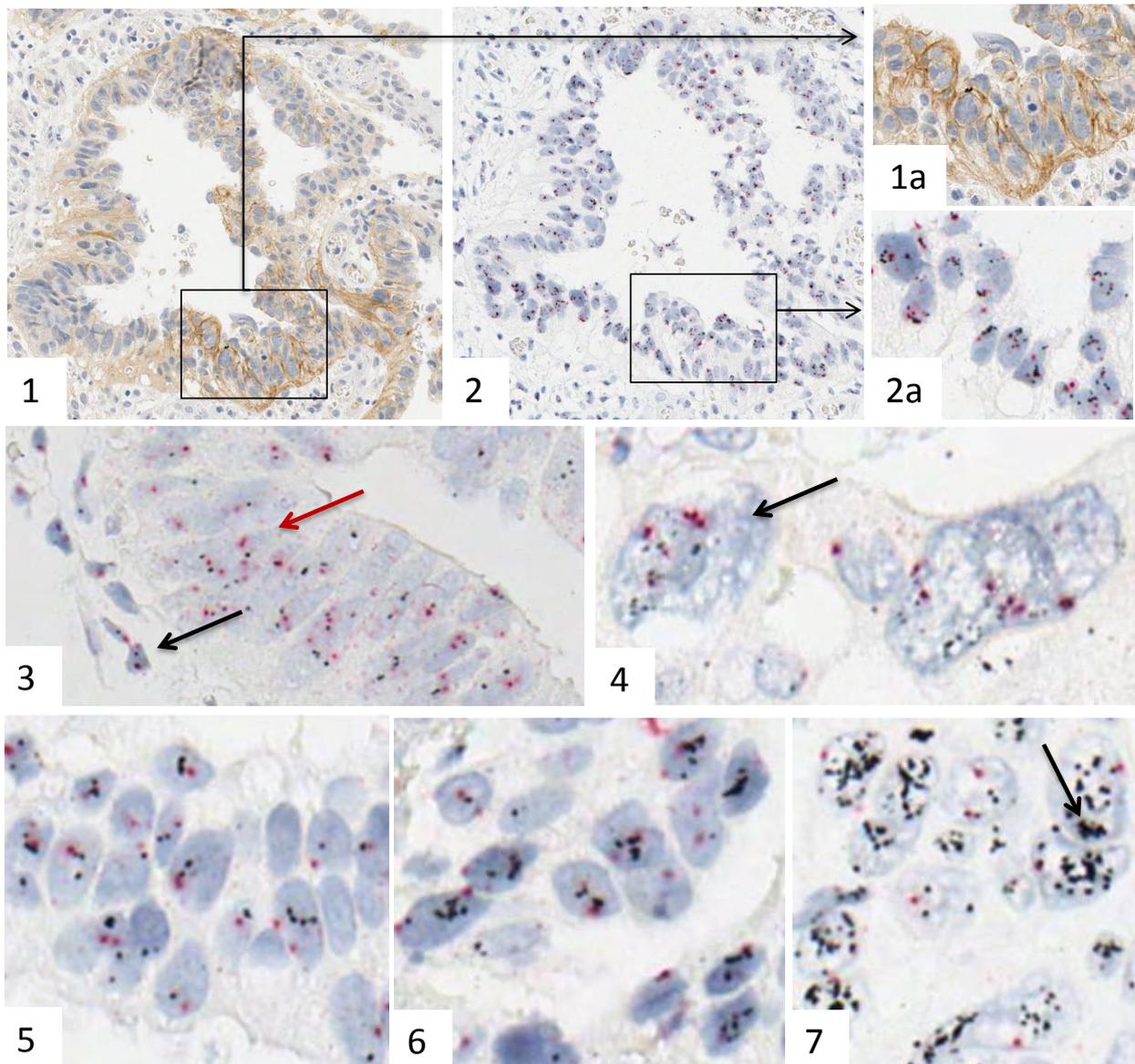
**Übersicht über die Auswertung (s. Abbildung 10):**

1. Die gefärbten ISH-Präparate wurden zunächst auf die Qualität ihres Gewebes und der Signale überprüft. Die Färbung des Gewebes musste eine Auszählung mit akzeptabler Größe (mindestens 20 Karzinomzellen) im Zielbereich zulassen, die Hintergrundfärbung (z.B. feine Staubkörper verschiedener Größe) durfte die Auszählung nicht beeinträchtigen und die als interne Positivkontrolle dienenden Zellkerne mussten adäquat gefärbt sein. Die Kerne dieser Nicht-Tumorzellen (normale Stromazellen) wiesen meist ein oder zwei HER-2- und Chr-17-Signale auf (s. Abbildung 11). Weiterhin durfte das Gewebe keine blasenförmigen Zellkerne ("Kernbubbles") enthalten, welche bei Unterfixierung der Gewebeprobe auftreten konnten. Eine inadäquate Gewebefärbung bedurfte eine Wiederholungsfärbung.
2. In einem zweiten Schritt wurde ein Tumorareal aufgesucht, welches im korrespondierenden IHC-Präparat IHC 2+ klassifiziert wurde. Der ausgewählte Zielbereich sollte folgende Bedingungen erfüllen (s. Abbildung 11):
  - Die Mehrzahl der Zellen musste sowohl S-ISH- als auch Red-ISH-Hybridisierungssignale aufweisen. Keine Signale oder nur schwache Signale durften nicht in die Wertung einfließen.
  - Überlappende Zellkerne durften nicht ausgezählt werden.
  - Die Signale sollten in ihrer Größe übereinstimmen. Bei zu großen oder zu kleinen Signalen konnte es sich um Staub oder eine unspezifische Färbung handeln; diese sollten nicht berücksichtigt werden.
3. In 20 repräsentativen, adäquat gefärbten Zellkernen wurden die roten und schwarzen Signale gezählt und das Verhältnis der Anzahl der HER-2-Signale und Anzahl der Chr-17-Signale berechnet. Mit Hilfe der Ratio ließ sich der HER-2-Genstatus als 'amplifiziert' oder 'nicht amplifiziert' klassifizieren.



**Abbildung 10: HER-2-Dual-ISH-Testalgorithmus (modifiziert nach Grogan et al. 2010, S. 9)**

Die Gewebeschnitte (Biopsie bzw. Resektat) wurden mittels Dual-ISH gefärbt. Nach Ausschluss inadäquater Färbung wurde ein Tumorareal im IHC-Präparat mit IHC 2+ ausfindig gemacht. Parallel wurde im korrespondierenden ISH-Präparat das jeweilige Tumorareal identifiziert. Die schwarzen und roten Signale in 20 kohäsiv repräsentativen Zellen wurden gezählt und die Ratio aus dem Verhältnis HER-2-Gen/Chr 17 berechnet. Lag die Ratio zwischen 1.8 und 2.2, mussten 20 weitere Zellkerne mit korrespondierenden Signalen ausgezählt werden. Bei einer Ratio von  $< 2.0$  gilt die ISH als nicht amplifiziert, bei einer Ratio von  $\geq 2.0$  als amplifiziert.



**Abbildung 11: HER-2-Dual-ISH-Färbungen**

- 1+1a (20x):** IHC-Färbung Score 2+
- 2+2a (2, 20x; 2a, 40x):** ISH-Präparat; nach Auffinden des zugehörigen Tumorareals des IHC-Präparats (1+1a), kann die Zählung von 20 adäquat gefärbten Zellen erfolgen
- 3 (40x):** ISH-Präparat; die rötliche Hintergrundfärbung erschwert und verfälscht die Auszählung der roten Signale (s. roten Pfeil); Stromazellen (s. schwarzen Pfeil) dienen als interne Positivkontrolle der Färbung
- 4 (40x):** ISH-Präparat; durch Unterfixierung der Gewebeprobe entstandene Kernbubbles (s. Pfeil)
- 5 (40x):** ISH-Präparat; nicht überlappende Zellkerne, gut isolierte schwarze und rote Signale; nicht amplifiziert
- 6 (40x):** Ausschnitt eines amplifizierten ISH-Präparates (Ratio  $\geq 2.0$ )
- 7 (40x):** Hoch amplifizierter HER-2-Genstatus; positives ISH-Präparat zur Kontrolle eines IHC 3+ klassifizierten IHC-Präparates; SISH-Cluster (s. Pfeil) können auf Grundlage der Größe eines einzelnen isolierten Referenzsignals in einer benachbarten Zelle abgeschätzt werden

## 2.10 Follow-Up-Untersuchungen

Sämtliche Patienten wurden während ihrer Behandlung wöchentlich kontrolliert. Das Langzeit-Follow-Up wurde nach Vorgabe der Studienprotokolle und geltender S3-Leitlinie (Schmiegel et al. 2010) durchgeführt und beinhaltete nach Abschluss der multimodalen Therapie folgende Nachsorgeuntersuchungen: Anamnese, klinische Untersuchung, Tumormarkerkontrolle (CEA), Rektoskopie, Abdomensonographie, CT-Abdomen und -Becken sowie Röntgen-Thorax. Die Nachsorgeuntersuchungen erfolgten in den ersten 2 Jahren vierteljährlich, nach 2 Jahren halbjährlich und ab dem 5. Jahr einmal jährlich für einen gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (Schmiegel et al. 2010). Dabei wurden neu aufgetretene Rezidive, Fernmetastasen sowie eingetretener Tod des Patienten dokumentiert.

Das krankheitsfreie Überleben wurde als Intervall zwischen der Rektumresektion und dem erneuten Auftreten eines Lokalrezidivs oder Fernmetastasen definiert. Der histologische Nachweis des neu aufgetretenen Lokalrezidivs oder Fernmetastasen erfolgte bei allen der Patienten. Das tumorspezifische Gesamtüberleben wurde als Intervall zwischen der Resektion des Rektumkarzinoms und dem tumorbedingten Tod des Patienten definiert.

## 2.11 Statistische Analysen

Die Korrelation des HER-2-Status mit kliniko-pathologischen Parametern (uT, uN, TRG, (y)pT, (y)pN, (y)pUICC, R-Status) wurde mit Hilfe des *Fisher exact test* bestimmt. Die Korrelation des HER-2-Status mit dem DFS und CSS wurde in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mittels Logrank-Test auf statistische Signifikanz überprüft.

Die uni- und multivariaten Analysen wurden mit Hilfe des Cox-Proportional-Hazards-Modells hinsichtlich der Parameter HER-2-Status, (y)pT, (y)pN, R-Status und Therapieregime durchgeführt. Für vergleichende Analysen der kliniko-pathologischen Charakteristika wurde der  $\chi^2$ -Test (Chi-Quadrat-Test) verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde für sämtliche Analysen auf  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0.05$ ) festgesetzt. Alle Analysen wurden mit der statistischen Software R, Version 2.13.1 durchgeführt und die Überlebensdaten mit dem *R-package-Survival* berechnet (RDC 2011).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Resektionsverfahren

Alle 264 Patienten wurden mit kurativer Intention operiert. Grundlage der onkologischen Rektumchirurgie ist neben der R0-Rektumresektion die TME (oder noch fraglich die PME) in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Liersch et al. 2005; s. Kapitel 2.3).

Die Operationsmethoden unterteilten sich in 166 (63%) TARR, in 73 (28%) APE, 19 (7%) ARR, und 6 (2%) Resektionen nach Hartmann (s. Tabelle 7). Im Rahmen der GAST-05-Studie wurden 18 Patienten mit einem Rektumkarzinom im oberen Rektumdrittel mittels ARR und PME behandelt. Von 97 Patienten mit Lokalisation des Tumors im unteren Rektumdrittel konnten 33 Patienten (34%) kontinenzershaltend (unter Sphinktererhalt) operiert werden. Bei Patienten mit Tumorlokalisation im unteren Rektumdrittel mussten 67% des Kollektivs A (2 von 3 Patienten) und 69% des Kollektivs B (44 von 64 Patienten) unter Entfernung des Sphinkters operiert werden. Die Anzahl der APE des intensiviert behandelten Kollektivs mit Tumorlokalisation im unteren Drittel lag bei 53% (16 von 30 Patienten).

**Tabelle 7: Charakterisierung der Subkollektive nach Operationsmethoden**

| <u>Therapieregime</u>  | Keine neoadjuvante RCT<br>(Kollektiv A) |    | Neoadjuvante RCT mit Standard 5-FU<br>(Kollektiv B) |    | Neoadjuvante RCT mit 5-FU/Oxaliplatin<br>(Kollektiv C) |    | p-Wert* |
|--|---|----|---|----|--|----|---------|
|  | n=47                                    | %  | n=145   | %  | n=72   | %  |         |
| <u>Operationsmethoden</u>  |   |    |   |    |  |    |         |
| <b>Rektumresektion</b>   |   |    |   |    |  |    |         |
| anteriore  | 18                                      | 38 | 1   | 1  | 0  | 0  | <0.001  |
| tiefe anteriore <sup>#</sup>   | 26                                      | 55 | 88  | 61 | 52   | 72 |         |
| abdominoperineale <sup>#</sup>   | 2                                       | 4  | 54  | 37 | 17   | 24 |         |
| nach Hartmann <sup>#</sup>   | 1                                       | 2  | 2   | 1  | 3  | 4  |         |
| * p-Wert Berechnung mit Chi-Quadrat-Test   |   |    |   |    |  |    |         |
| <sup>#</sup> alle Rektumresektionen bis auf die anteriore Rektumresektion erfolgten mit standardisierter und qualitätskontrollierter TME |   |    |   |    |  |    |         |

### 3.2 Histopathologisches Tumorstaging

Nach dem jeweiligen Resektionsverfahren und der Entnahme des Rektumkarzinomresektates erfolgte die histopathologische Aufarbeitung. Die erhobenen postoperativen Parameter sind in Tabelle 8 erfasst.

Bei allen Patienten wurde während der Operation ein R0-Resektions-Status angestrebt. Histopathologisch wurde tatsächlich ein R0-Residualstatus in 225 Fällen (97%) klassifiziert. Bei 7 Patienten (3%) lag eine R1-Situation vor (positiver CRM) und in 2 Fällen (1%) ein lokaler R2-Residualstatus. Zusammenfassend konnte nach primärer OP ein R0-Residualstatus in 94% der Fälle und nach präoperativer RCT in 97% der Fälle erreicht werden (s. Tabelle 8).

#### Primär operierte Patienten (n=47):

Bei 38 Patienten (81%) zeigte sich nach erfolgter Rektumresektion ein pT3-Status. In 13% der Fälle reichte die Tumorfiltration bis in die Muscularis propria (pT2, 6 Patienten) und bei einem Patienten bis in die Submukosa (pT1, pUICC-I). Bei 2 Patienten (4%) wurde eine Ausbreitung des Tumors in Nachbarorgane (pT4) mit histopathologisch gesichertem positiven LK-Status festgestellt (pUICC-IV). Von den primär operierten Patienten traten insgesamt in 21% der Fälle ein pN1-Status und in 17% der Fälle ein pN2-Status auf.

#### Patienten nach neoadjuvanter RCT (Patientenkohorte B und C; n=217):

Die neoadjuvant vorbehandelten Patienten haben im Vergleich zu den primär Operierten einen niedrigeren (y)pT-Status ( $p=0.04$ ). Während ca. 50% der vorbehandelten Patienten (y)pT3 klassifiziert wurden, waren es im Vergleich 81% der primär Operierten. Insgesamt konnte bei 9 Patienten (6%) des Patientenkollektivs B und 3 Patienten (4%) des Patientenkollektivs C ein (y)pT4-Status nachgewiesen werden. Dies ist annähernd vergleichbar mit den Daten der primär Operierten (4%; n=2). Bei 17 vorbehandelten Patienten (8%) konnte zudem ein (y)pT0-Status erreicht werden. Weiterhin ist die lymphogene Metastasierung in dem vorliegendem Patientenkollektiv mit 24% (y)pN1 und 13% (y)pN2 in der Patientengruppe nach 5-FU-Monotherapie höher als in der intensiviert behandelten Gruppe unter Oxaliplatin (18% (y)pN1 und 11% (y)pN2).

Über 50% der Patienten, die neoadjuvant vorbehandelt wurden, zeigten ein gutes Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie (deutlicher Tumorregressionsgrad; TRG 3). Bei insgesamt 17 Patienten (elf Kollektiv B und sechs Kollektiv C; jeweils 8%; s. Tabelle 8) konnte sogar eine pCR des Tumors erzielt werden (TRG 4). Es zeigt sich zudem ein deutlicher Trend zu einem verstärkten T-Status-*Downsizing* unter der intensivierten Therapie mit Oxaliplatin.

Ein T-Level-*Downsizing* konnte bei 61 Patienten (42%) nach 5-FU-Monotherapie und bei 35 Patienten (49%) nach intensivierter RCT nachgewiesen werden. Weiterhin trat ein UICC-*Downstaging* (Verbesserung des (y)pUICC-Tumorstagings im Vergleich zum cUICC-Stadium) bei 73 Patienten (50.3%) der Patientenkohorte B und bei 42 Patienten (58.3%) der Patientenkohorte C auf.

Tabelle 8: Charakterisierung der Subkollektive mit postoperativen, kliniko-pathologischen Parametern

| <u>Therapieregime</u>   | Keine neoadjuvante RCT (Kollektiv A) |    | Neoadjuvante RCT mit Standard 5-FU (Kollektiv B) |    | Neoadjuvante RCT mit 5-FU/Oxaliplatin (Kollektiv C) |    | p-Wert* |
|---|--------------------------------------|----|--|----|---|----|---------|
|   | n=47                                 | %  | n=145  | %  | n=72  | %  |         |
| <b>Postoperative, histo-pathologische Parameter</b>   |                                      |    |  |    |   |    |         |
| <b>Resektions-Status</b>  |                                      |    |  |    |   |    |         |
| R0  | 44                                   | 94 | 140  | 97 | 71  | 99 | 0.31    |
| R1  | 3                                    | 6  | 3  | 2  | 1   | 1  |         |
| R2  | 0                                    | 0  | 2  | 1  | 0   | 0  |         |
| <b>Tumorregression</b>  |                                      |    |  |    |   |    |         |
| 0 keine   | -                                    | -  | 0  | 0  | 0   | 0  | 0.41    |
| 1 gering (<25%)   | -                                    | -  | 20   | 14 | 8   | 11 |         |
| 2 moderat (<50%)  | -                                    | -  | 39   | 27 | 13  | 18 |         |
| 3 deutlich (>50% bis <100%)   | -                                    | -  | 75   | 52 | 45  | 63 |         |
| 4 total (100%)  | -                                    | -  | 11   | 8  | 6   | 8  |         |
| <b>(y)pT-Status</b>   |                                      |    |  |    |   |    |         |
| 0   | 0                                    | 0  | 9  | 6  | 8   | 11 | 0.04    |
| 1   | 1                                    | 2  | 9  | 6  | 7   | 10 |         |
| 2   | 6                                    | 13 | 38   | 26 | 17  | 24 |         |
| 3   | 38                                   | 81 | 80   | 55 | 37  | 51 |         |
| 4   | 2                                    | 4  | 9  | 6  | 3   | 4  |         |
| <b>(y)pN-Status</b>   |                                      |    |  |    |   |    |         |
| 0   | 29                                   | 62 | 91   | 63 | 51  | 71 | 0.71    |
| 1   | 10                                   | 21 | 35   | 24 | 13  | 18 |         |
| 2   | 8                                    | 17 | 19   | 13 | 8   | 11 |         |
| <b>(y)pUICC-Status</b>  |                                      |    |  |    |   |    |         |
| 0   | 0                                    | 0  | 8  | 6  | 8   | 11 | 0.02    |
| I   | 6                                    | 13 | 32   | 22 | 22  | 31 |         |
| II  | 23                                   | 49 | 45   | 31 | 18  | 25 |         |
| III   | 16                                   | 34 | 48   | 33 | 16  | 22 |         |
| IV  | 2                                    | 4  | 12   | 8  | 8   | 11 |         |
| * p-Wert Berechnung mit Chi-Quadrat-Test; für die Altersdifferenz wurde der Kruskal-Wallis-Rank-Test angewendet |                                      |    |  |    |   |    |         |

### 3.3 Klinischer Langzeitverlauf

In einem Zeitintervall von maximal 156 Monaten (Median 46.5 Monate) erfolgte bei allen Patienten eine strukturierte onkologische Nachsorge zur frühzeitigen Entdeckung von neu aufgetretenen Lokalrezidiven oder Fernmetastasen (s. Kapitel 2.10).

Bei fast 70% aller Patienten (n=175) konnten Rezidive im Nachsorgezeitraum bis Oktober 2011 ausgeschlossen werden (s. Tabelle 9). Die Follow-Up-Zeit betrug in der Gruppe der primär Operierten 36 Monate (Minimum 13 bis maximal 113 Monate), bei den vorbehandelten Patienten nach 5-FU-Monotherapie 59 Monate (Minimum 11 bis maximal 156 Monate) und bei den intensiviert vorbehandelten Patienten 40 Monate (Minimum 17 bis maximal 93 Monate).

Insgesamt betrug die Lokalrezidivrate (LRR) 8% (n=21) und die Fernmetastasierungsrate (FMR) 26% (n=68). Bei 15 Patienten (6%) konnte ein lokoregionäres und fernmetastatisches Rezidiv nachgewiesen werden (s. Tabelle 9). Von den Fernmetastasen traten 34% (n=23) peritoneal und/oder anderorts, 31% (n=21) intrahepatisch, 28% (n=19) intrapulmonal und 7% (n=5) intrahepatisch und intrapulmonal auf. Infolgedessen sind 40 Patienten (15%) tumorbedingt verstorben. Davon waren 5 Patienten (11%) des Patientenkollektivs A, 25 Patienten (17%) des Patientenkollektivs B sowie 10 Patienten (14%) des Patientenkollektivs C betroffen.

Betrachtet man isoliert die Gruppe der primär operierten Patienten, ergibt sich eine LRR von 12.8% (n=6) sowie eine FMR von 14.9% (n=7). Im Vergleich dazu kann man bei der vorbehandelten Gruppe mit 5-FU-Monotherapie eine niedrigere LRR von 8.3% (n=12) und eine erhöhte FMR von 28.97% (n=42) beobachten. Die intensiviert vorbehandelte Gruppe weist eine noch kleinere LRR als die anderen beiden Patientenkohorten auf (4.2%; n=3). Dagegen ist die FMR hier auch höher als bei den primär Operierten (26.4%; n=19). Zudem sind in 47% der diagnostizierten Metastasen in dem angegebenen Zeitraum in der Leber lokalisiert (n=9; s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Korrelation der Follow-Up-Daten

| <u>Therapieregime</u>   | Keine neoadjuvante RCT<br>(Kollektiv A) |    | Neoadjuvante RCT mit<br>Standard 5-FU<br>(Kollektiv B) |    | Neoadjuvante RCT<br>mit 5-FU/ Oxaliplatin<br>(Kollektiv C) |    |
|---|---|----|--|----|--|----|
|   | n=47                                    | %  | n=145  | %  | n=72   | %  |
| <b>Follow-Up-Untersuchungen (Nachsorgeintervall: 156 Monate; Median 46.5 Monate;<br/>letzter Nachbeobachtungsmonat 10/2011)</b> |   |    |  |    |  |    |
| <b>Rezidive</b>   |   |    |  |    |  |    |
| Keine   | 34                                      | 72 | 91   | 63 | 50   | 69 |
| Lokal   | 6                                       | 13 | 12   | 8  | 3  | 4  |
| Fernmetastasen  | 4                                       | 9  | 32   | 22 | 17   | 24 |
| Lokal und Fernmetastasen  | 3                                       | 6  | 10   | 7  | 2  | 3  |
| <b>Fernmetastasen</b>   |   |    |  |    |  |    |
| Hepar   | 2                                       | 29 | 10   | 24 | 9  | 47 |
| Pulmo   | 2                                       | 29 | 13   | 31 | 4  | 21 |
| Hepar und pulmo   | 1                                       | 14 | 3  | 7  | 1  | 5  |
| Peritoneal und/ oder andere   | 2                                       | 29 | 16   | 38 | 5  | 26 |
| <b>Follow-Up-Zeit</b>   |   |    |  |    |  |    |
| Mittelwert  | 36                                      |    | 59   |    | 40   |    |
| Min - Max   | 13 - 113                                |    | 11 - 156   |    | 17 - 93  |    |
| <b>Tumorbedingter Tod</b>   | 5                                       | 11 | 25   | 17 | 10   | 14 |

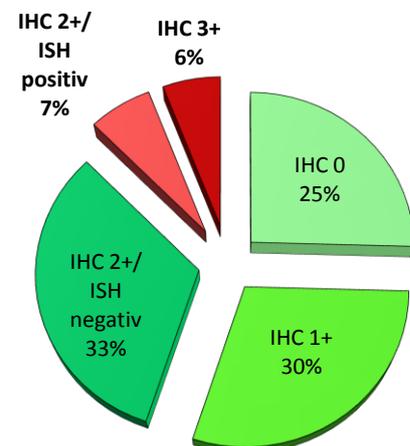
### 3.4 HER-2-Status in prätherapeutischen Biopsien

Insgesamt waren 169 prätherapeutische Biopsien für die IHC-Auswertung verwertbar. Der HER-2-Status wurde bei 66 Präparaten mit dem ermittelten IHC Score 2+ und bei allen Gewebeproben mit dem IHC Score 3+ (n=10) mittels ISH auf Genamplifikation überprüft (s. Abbildung 12). Die Beurteilung der Biopsien ergab eine HER-2-Positivitätsrate von 12.4% (n=21) und einen negativen HER-2-Status bei 148 Gewebeproben (87.5%).

Bei der Untersuchung der ISH-gefärbten Gewebepreparate konnten 11 (6.5%) der insgesamt 66 IHC 2+ beurteilten Proben als amplifiziert diagnostiziert werden mit einer Ratio von 2.29 im Mittel. Bei allen IHC 3+ bewerteten Biopsieproben, bei denen zur Absicherung der HER-2-Positivität zusätzlich eine ISH durchgeführt wurde, konnte eine hohe Genamplifikation nachgewiesen werden (Ratio > 2.7).

Insgesamt 83.3% (55 von 66 Biopsien) der IHC 2+ Biopsien wiesen bei der Auszählung der Signale und anschließender Berechnung der Ratio keine HER-2-Genamplifikation auf (Mittelwert der ISH-negativen Biopsien: 1.35), sodass diese nicht-amplifizierten Gewebeproben definitionsgemäß als HER-2-negativ klassifiziert wurden.

| Score               | Biopsien (n=169) | %    | HER-2-Status       |
|---------------------|------------------|------|--------------------|
| IHC 0               | 43               | 25.4 | negativ<br>(87.5%) |
| IHC 1+              | 50               | 29.6 |                    |
| IHC 2+/ ISH-negativ | 55               | 32.5 |                    |
| IHC 2+/ ISH-positiv | 11               | 6.5  |                    |
| IHC 3+              | 10               | 5.9  |                    |
|                     |                  |      | positiv<br>(12.4%) |



**Abbildung 12: HER-2-Status in prätherapeutischen Biopsien**

Die Abbildung zeigt die Auswertung der Biopsien mittels IHC und ISH. Die Tabelle umfasst die absoluten und relativen Zahlen der ausgewerteten Biopsie-Präparate, unterteilt in die jeweiligen IHC Scores (0, 1+, 2+, 3+) sowie ISH-negativ und ISH-positiv. Das Kreisdiagramm dient zur Darstellung der Anteile der jeweiligen Scores und hebt den positiven HER-2-Status (gekennzeichnet mit rötlicher Färbung) von dem grün-hinterlegten negativen HER-2-Status ab.

### 3.5 HER-2-Status im Rektumkarzinomresektat

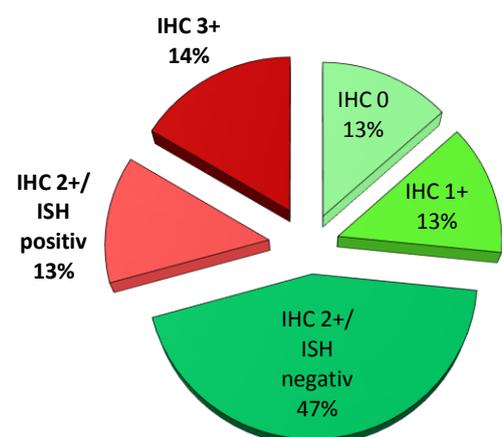
Für die Detektion des HER-2-Status konnten 225 IHC-gefärbte Rektumkarzinomresektate des gesamten Patientenkollektivs (N=264) beurteilt werden. Wie bereits in Kapitel 2.5 erläutert, konnten 39 Resektat-Präparate auf Grund eines sehr guten Ansprechens auf die präoperative RCT und folglich kaum vorhandener vitaler Karzinomzellen (TRG 3b und TRG 4) nicht in die Analyse mit einbezogen werden.

Die verbliebenen beurteilbaren Resektate (n=225) zeigten eine HER-2-Positivitätsrate von 26.7% (n=60; s. Abbildung 13), während 73.3% (n=165) keine oder nur eine geringe HER-2-Proteinüberexpression aufwiesen (IHC 0 und 1+).

Die Analysen der ISH-Färbungen (n=134) der als IHC 2+ beurteilten Schnitte zeigten bei 29 (13%) Gewebeproben eine HER-2-Genamplifikation (Ratio  $\geq 2.0$ ); analog dazu wurden 105 (47%) Proben als nicht-amplifiziert beurteilt (Ratio  $< 2.0$ ). Alle 3+ gefärbten IHC-Präparate (n=31) wurden ebenfalls auf Genamplifikation geprüft und konnten zu 100% als amplifiziert klassifiziert werden.

Bei allen als Kontrolle dienenden ISH-Nachfärbungen der als IHC 0 (n=5) und IHC 1+ (n=5) beurteilten Proben konnte dagegen erwartungsgemäß keine HER-2-Genamplifikation nachgewiesen werden.

| Score               | Resektate (n=225) | %    | HER-2-Status        |
|---------------------|-------------------|------|---------------------|
| IHC 0               | 30                | 13.3 | negativ<br>(73.3 %) |
| IHC 1+              | 30                | 13.3 |                     |
| IHC 2+/ ISH-negativ | 105               | 46.7 |                     |
| IHC 2+/ ISH-positiv | 29                | 12.9 | positiv<br>(26.7%)  |
| IHC 3+              | 31                | 13.8 |                     |



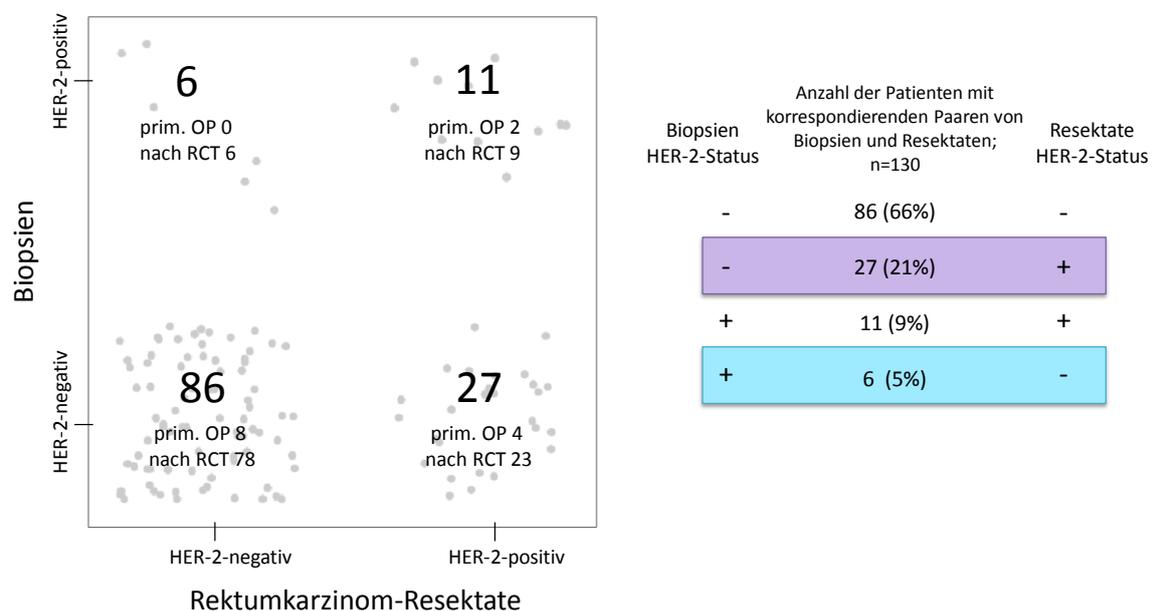
**Abbildung 13: HER-2-Status im Rektumkarzinomresektat**

Analog zu Abbildung 12 wurden die Ergebnisse der Auswertung der Rektumkarzinomresektate dargestellt.

### 3.6 Vergleich des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem HER-2-Status aus Tumorgewebe nach Rektumresektion

Insgesamt konnte bei 130 Patienten die prätherapeutische Biopsie einem korrespondierenden Rektumkarzinomresektat zugeordnet werden (s. Kapitel 2.5). Die Beurteilung des HER-2-Status im Resektat zeigte in der Hälfte der Fälle heterogene ( $\leq 30\%$  positive Tumorzellen) oder eine nur fokal ausgeprägte HER-2-Positivität. Diese Feststellung deckt sich mit dem Ergebnis aus dem Vergleich des ermittelten HER-2-Status der Biopsie mit dem dazu gehörigen Resektat: Bei 27 Paaren (21%) wurde die Biopsie als HER-2-negativ befundet, während das Resektat HER-2-positiv gewertet wurde (s. Abbildung 14).

Weiterhin war die umgekehrte Konstellation - HER-2-positive Biopsie versus HER-2-negatives Resektat - in nur sechs der Paare (5%) zu finden. Interessanterweise wurden alle sechs Patienten neoadjuvant vorbehandelt (vier RCT mit 5-FU und zwei RCT mit 5-FU und Oxaliplatin).



**Abbildung 14: Vergleich des HER-2-Status der Biopsie mit dem korrespondierenden Resektat**

Im linken Teil der Abbildung ist die Gegenüberstellung des HER-2-Status der Biopsie (y-Achse) mit dem Resektat (x-Achse) mit zusätzlichen Angaben zur Vorbehandlung (primäre OP bzw. nach RCT) dargestellt. Rechts sind die gleichen Ergebnisse in einem anderen Format dargestellt. Es wird ersichtlich, dass ein Fünftel der Paare einen negativen HER-2-Status in der Biopsie, jedoch einen positiven HER-2-Status im Resektat aufweisen (violett

hinterlegt). Blau hinterlegt ist die umgekehrte Konstellation - HER-2-positive Biopsie mit HER-2-negativem Resektat.

### **3.7 Korrelation des HER-2-Status prätherapeutischer Biopsien und von Tumorresektaten mit klinischen Parametern**

#### **Prätherapeutische Biopsien**

Die Korrelation des HER-2-Status der prätherapeutischen Biopsien mit prätherapeutischen klinischen Parametern (Geschlecht, Alter, Tumordinfiltrationstiefe (cT), LK-Status (cN), cUICC) und mit kliniko-pathologischen Parametern (TRG, (y)pT, (y)pN, (y)pUICC, Resektions-Status) zeigte keine Signifikanz.

Es ist jedoch zu beobachten, dass das Kollektiv nach intensiver RCT den höchsten Anteil an HER-2-positiven Biopsien stellt (21%, s. Tabelle 10), während primär Operierte mit 14% und die neoadjuvant behandelten Patienten mit RCT und 5-FU nur in 7% der Fälle HER-2-positive Biopsien aufwiesen.

#### **Rektumkarzinomresektate**

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Biopsien, ergab die Korrelation des HER-2-Status aus den Rektumkarzinomresektaten mit prä- und postoperativen klinischen Kriterien folgende Aspekte (s. Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12):

1. Der positive HER-2-Status korrelierte mit einem negativen cN-Status ( $p=0.021$ ) sowie einem geringeren cUICC-Stadium ( $p=0.031$ ). Auffällig war der in 72% ( $n=120$ ) der HER-2-negativen Resektate erhobene positive Lymphknotenbefall, während die HER-2-positiven Resektate zu etwa gleichen Teilen einen positiven (57%) und negativen (43%) Lymphknotenbefall aufwiesen. Zusammenfassend zeigt sich in der untersuchten Patientenpopulation eine stärkere Assoziation des cUICC-III-Stadiums mit einem negativem HER-2-Status (68% HER-2-negativ versus 55% HER-2-positiv).
2. In der neoadjuvant behandelten Kohorte wurde eine signifikant geringere HER-2-Expression und -Genamplifikation im Vergleich zur Kontrollgruppe (primär Operierte) detektiert ( $p=0.009$ ). Von 40 Patienten, die mit primärer Rektumresektion behandelt wurden, konnte bei 18 Patienten (45%) ein positiver HER-2-Status im Rektumkarzinomresektat nachgewiesen werden (s. Tabelle 10). Patienten mit

neoadjuvanter RCT (5-FU-mono oder 5-FU mit Oxaliplatin; n=185) zeigten eine vergleichsweise niedrigere HER-2-Positivität (23%, n=42).

**Tabelle 10: HER-2-Expression und -Genamplifikation in cUICC-II/-III Rektumkarzinomen**

| <b>HER-2-Expression und -Genamplifikation in cUICC-II/-III-Rektumkarzinomen</b> |   |          |   |          |  |          |
|---|---|----------|---|----------|--|----------|
| <b>Therapieregime</b>   | <b>Keine neoadjuvante RCT (Kollektiv A)</b> |          | <b>Neoadjuvante RCT mit Standard 5-FU (Kollektiv B)</b> |          | <b>Neoadjuvante RCT mit 5-FU/Oxaliplatin (Kollektiv C)</b> |          |
| <b>Patientenanzahl</b>  | <b>n = 21</b>                               | <b>%</b> | <b>n = 96</b>   | <b>%</b> | <b>n = 52</b>  | <b>%</b> |
| <b>Material <u>Biopsie</u></b>  |   |          |   |          |  |          |
| <b>HER-2-Biopsie (n=169)</b>  |   |          |   |          |  |          |
| IHC 0   | 6   | 29       | 24  | 25       | 13   | 25       |
| IHC 1+  | 9   | 43       | 33  | 34       | 8  | 15       |
| IHC 2+      ISH negativ   | 3   | 14       | 32  | 33       | 20   | 38       |
| ISH positiv   | 2   | 10       | 4   | 4        | 5  | 10       |
| IHC 3+  | 1   | 5        | 3   | 3        | 6  | 12       |
| <b>HER-2-Biopsie - gesamt</b>   |   |          |   |          |  |          |
| HER-2-positiv   | 3   | 14       | 7   | 7        | 11   | 21       |
| HER-2-negativ   | 18  | 86       | 89  | 93       | 41   | 79       |
| <b>Patientenanzahl</b>  | <b>n = 40</b>                               | <b>%</b> | <b>n = 127</b>  | <b>%</b> | <b>n = 58</b>  | <b>%</b> |
| <b>Material <u>Resektat</u></b>   |   |          |   |          |  |          |
| <b>HER-2-Resektat (n=225)</b>   |   |          |   |          |  |          |
| IHC 0   | 1   | 3        | 19  | 15       | 10   | 17       |
| IHC 1+  | 3   | 8        | 18  | 14       | 9  | 16       |
| IHC 2+      ISH negativ   | 18  | 45       | 64  | 50       | 23   | 40       |
| ISH positiv   | 8   | 20       | 14  | 11       | 7  | 12       |
| IHC 3+  | 10  | 25       | 12  | 9        | 9  | 16       |
| <b>HER-2-Resektat- gesamt</b>   |   |          |   |          |  |          |
| HER-2-positiv   | 18  | 45       | 26  | 20       | 16   | 28       |
| HER-2-negativ   | 22  | 55       | 101   | 80       | 42   | 72       |

Tabelle 11: Vergleich des HER-2-Status mit prätherapeutischen und operativen Parametern

| <u>Prätherapeutische und operative Parameter</u>  | <b>HER-2 negativ (n=165)</b> | <b>%</b> | <b>HER-2 positiv (n=60)</b> | <b>%</b> | <b>p-Wert*</b> |
|---|------------------------------|----------|-----------------------------|----------|----------------|
| <b>Alter (Jahre)</b>  |                              |          |                             |          |                |
| Mittelwert  | 63.1                         |          | 65.2                        |          | 0.2            |
| Min. - Max.   | 35 - 85                      |          | 41 - 83                     |          |                |
| <b>Geschlecht</b>   |                              |          |                             |          | 0.051          |
| Männlich  | 113                          | 68       | 49                          | 82       |                |
| Weiblich  | 52                           | 32       | 11                          | 18       |                |
| <b>Tumorlokalisation ab ano (cm)</b>  |                              |          |                             |          | 0.119          |
| 0-6 cm  | 63                           | 38       | 18                          | 30       |                |
| >6-12 cm  | 73                           | 44       | 24                          | 40       |                |
| >12-16 cm   | 29                           | 18       | 18                          | 30       |                |
| <b>cT-Status</b>  |                              |          |                             |          | 0.43           |
| 2   | 3                            | 2        | 0                           | 0        |                |
| 3   | 149                          | 90       | 57                          | 95       |                |
| 4   | 13                           | 8        | 3                           | 5        |                |
| <b>cN-Status</b>  |                              |          |                             |          | <b>0.021</b>   |
| Positiv   | 120                          | 72       | 34                          | 57       |                |
| Negativ   | 45                           | 27       | 26                          | 43       |                |
| <b>cUICC-Stadium</b>  |                              |          |                             |          | <b>0.031</b>   |
| II  | 43                           | 26       | 26                          | 43       |                |
| III   | 113                          | 68       | 33                          | 55       |                |
| IV  | 9                            | 5        | 1                           | 2        |                |
| <b>Rektumresektion</b>  |                              |          |                             |          | <b>0.016</b>   |
| anteriore   | 8                            | 5        | 11                          | 18       |                |
| tiefe anteriore <sup>#</sup>  | 105                          | 64       | 33                          | 55       |                |
| abdominoperineale <sup>#</sup>  | 48                           | 29       | 15                          | 25       |                |
| nach Hartman <sup>#</sup>   | 4                            | 2        | 1                           | 2        |                |
| * p-Wert Berechnung mit Chi-Quadrat-Test; für die Altersdifferenz wurde der Kruskal-Wallis-Rank-Test angewendet |                              |          |                             |          |                |
| # alle Rektumresektionen bis auf die anterioren Rektumresektionen (partiell mit PME) erfolgten mit TME          |                              |          |                             |          |                |

3. Der Vergleich der kliniko-pathologischen Parameter mit dem HER-2-Status ergab keine signifikante Korrelation: Der R-Status, der (y)pT, der (y)pN-Status sowie der (y)pUICC-Status unterschieden sich bezüglich ihres HER-2-Status nur gering. Es fällt jedoch auf, dass 53% der HER-2-negativen Patienten einen deutlichen Tumorregressionsgrad (TRG 3) aufwiesen (versus 37% der HER-2-positiven Patienten; s. Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleich des HER-2-Status mit postoperativen Parametern**

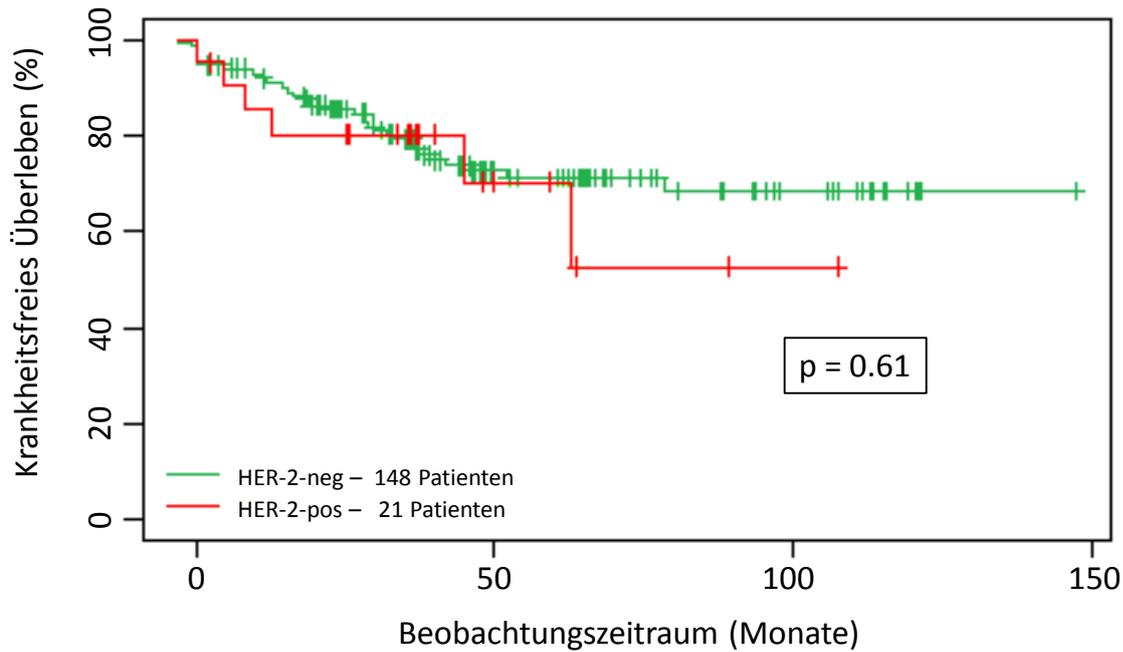
| <u>Postoperative Parameter</u>           | <b>HER-2 negativ<br/>(n=165)</b> | <b>%</b> | <b>HER-2 positiv<br/>(n=60)</b> | <b>%</b> | <b>p-Wert*</b> |
|--|----------------------------------|----------|---------------------------------|----------|----------------|
| <b>Resektions-Status</b>                 |                                  |          |                                 |          |                |
| R0                                       | 157                              | 95       | 59                              | 98       | 0.21           |
| R1                                       | 7                                | 4        | 0                               | 0        |                |
| R2                                       | 1                                | 1        | 1                               | 2        |                |
| <b>Tumorregressionsgrad</b>              |                                  |          |                                 |          |                |
| 0 keine                                  | 1                                | 1        | 0                               | 0        | 0.73           |
| 1 gering (< 25%)                         | 19                               | 12       | 6                               | 10       |                |
| 2 moderat (< 50%)                        | 37                               | 22       | 14                              | 23       |                |
| 3 deutlich (>50% bis <100%)              | 87                               | 53       | 22                              | 37       |                |
| 4 total (100%)                           | 0                                | 0        | 0                               | 0        |                |
| Keine Neoadjuvante Therapie              | 21                               | 13       | 18                              | 30       |                |
| <b>(y)pT-Status</b>                      |                                  |          |                                 |          |                |
| 0  | 4                                | 2        | 0                               | 0        | 0.623          |
| 1  | 11                               | 7        | 2                               | 3        |                |
| 2  | 38                               | 23       | 15                              | 25       |                |
| 3  | 102                              | 62       | 40                              | 67       |                |
| 4  | 10                               | 6        | 3                               | 5        |                |
| <b>(y)pN-Status</b>                      |                                  |          |                                 |          |                |
| 0  | 102                              | 62       | 36                              | 60       | 0.815          |
| 1  | 41                               | 25       | 14                              | 23       |                |
| 2  | 22                               | 13       | 10                              | 17       |                |
| <b>(y)pUICC-Status</b>                   |                                  |          |                                 |          |                |
| 0  | 3                                | 2        | 0                               | 0        | 0.287          |
| I  | 36                               | 22       | 13                              | 22       |                |
| II                                       | 55                               | 33       | 22                              | 37       |                |
| III                                      | 52                               | 32       | 23                              | 38       |                |
| IV                                       | 19                               | 12       | 2                               | 3        |                |
| * p-Wert Berechnung mit Chi-Quadrat-Test |                                  |          |                                 |          |                |

### 3.8 Korrelation des HER-2-Status mit dem tumorfreien und tumorspezifischen Überleben

Um die prognostische Bedeutung von HER-2 unabhängig vom jeweiligen Therapieregime im Rektumkarzinom zu beurteilen, wurde der HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien und aus den Karzinomresektaten getrennt voneinander mit dem tumorfreien und tumorspezifischen Überleben korreliert. Zur Darstellung der Ergebnisse dienen Kaplan-Meier-Kurven; die p-Werte sind in jeder Abbildung eingefügt.

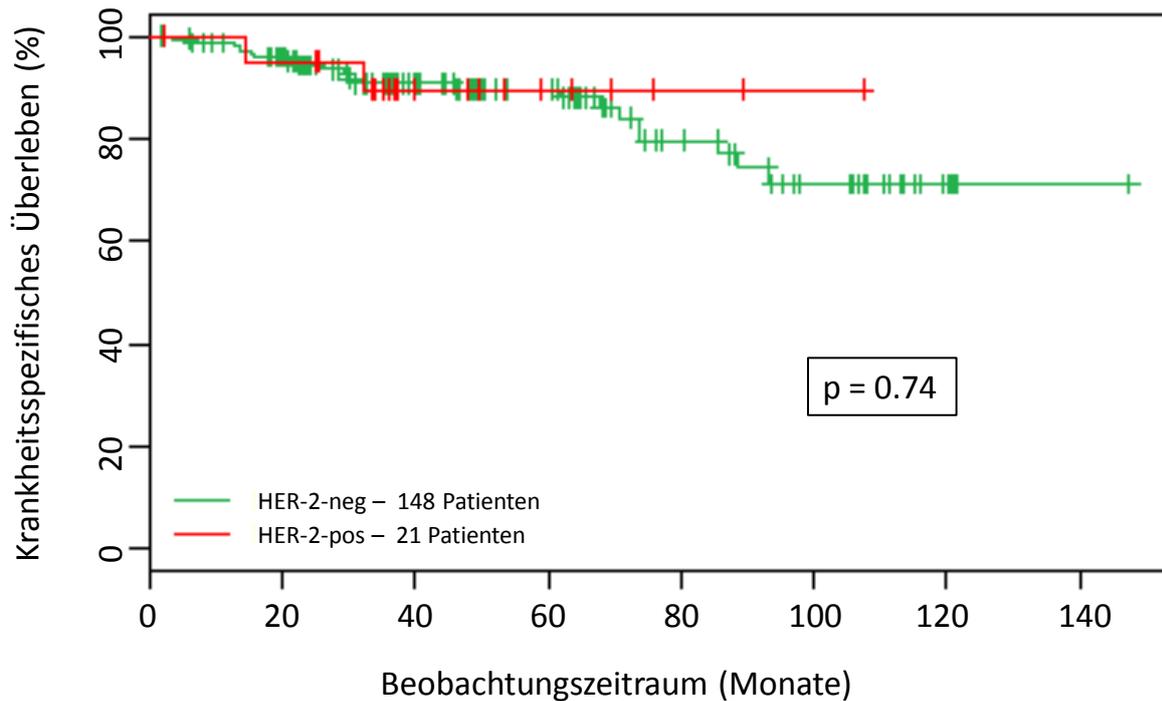
### 3.8.1 Korrelation des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem DFS und CSS

Der Beobachtungszeitraum für die Korrelation des HER-2-Status der Biopsien mit dem DFS umfasste insgesamt 150 Monate (s. Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Kurven zeigen keinen Unterschied des HER-2-Status in Bezug auf das DFS ( $p=0.61$ ) und das CSS ( $p=0.74$ ).



**Abbildung 15: Korrelation des HER-2-Status aus prätherapeutischen Biopsien mit dem DFS (n=169)**

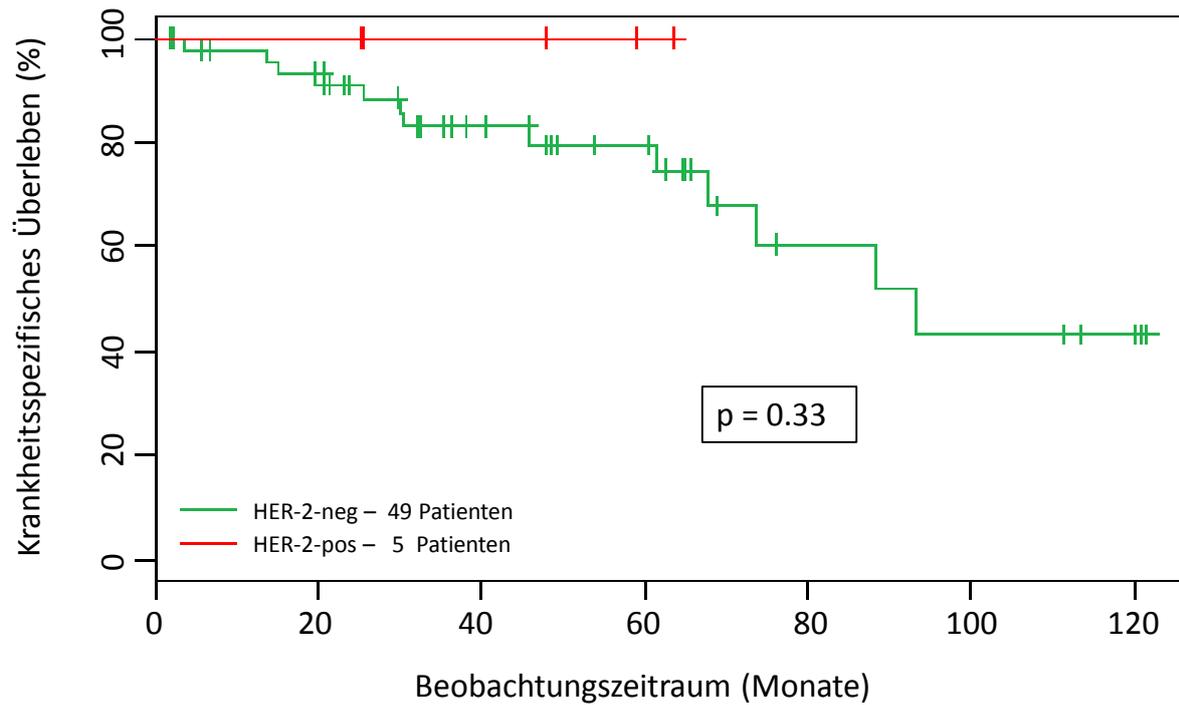
Die Kaplan-Meier-Kurve stellt die Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien mit dem DFS in einem Nachsorgeintervall von 148 Monaten dar. Es lässt sich beobachten, dass beide Kurven nah benachbart verlaufen. Beide Subkollektive zeigen keinen signifikanten Unterschied im DFS ( $p=0.61$ ).



**Abbildung 16: Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien mit dem CSS (n=169)**

In dieser Abbildung ist die Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien mit dem CSS in einem Beobachtungszeitraum von 148 Monaten dargestellt. Es lässt sich auch bei diesen Kurven kein signifikanter Unterschied zwischen HER-2-negativen und HER-2-positiven Patienten erkennen ( $p=0.74$ ).

Überdies wurde der HER-2-Status der Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation einen positiven LK-Status besaßen, mit dem CSS korreliert (s. Abbildung 17). Das untersuchte Patientenkollektiv für die Subgruppenanalyse der Nodal-positiven Patienten umfasst nur 54 Patienten. Bei dieser vergleichsweise kleinen Patientenzahl zeigt sich nur ein Trend ohne statistische Signifikanz ( $p=0.33$ ). Jedoch lässt sich interessanterweise beobachten, dass keiner der HER-2-positiven Patienten mit positivem Nodalstatus im Intervall von 60 Monaten verstorben ist.



**Abbildung 17: Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien von Patienten mit einem (y)pN+ Status und dem CSS (n=54)**

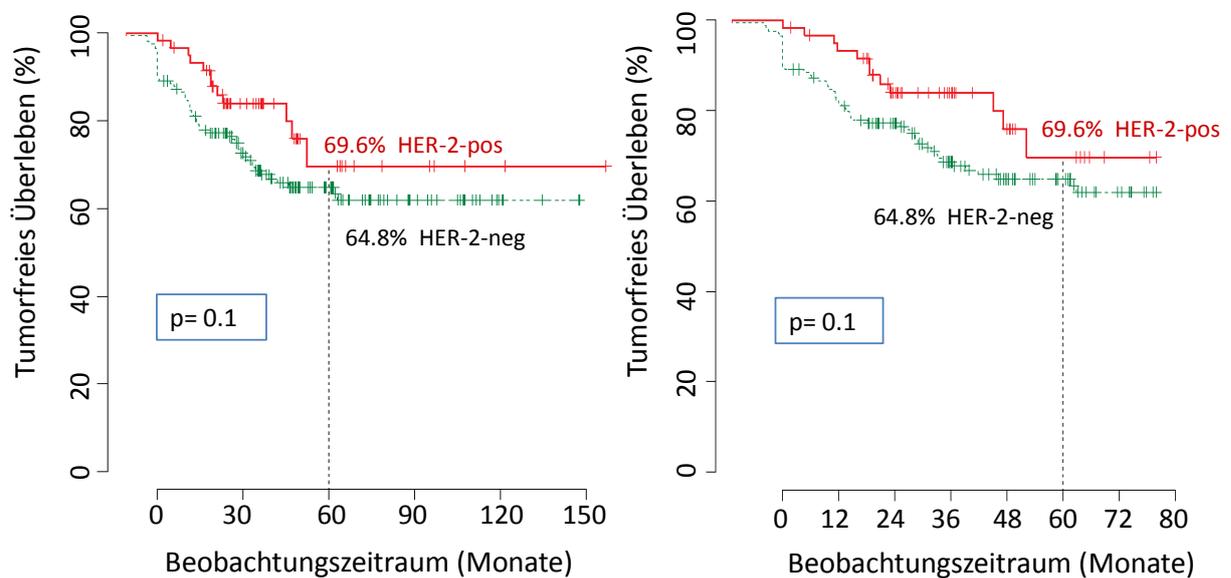
Die Abbildung erfasst die Korrelation des HER-2-Status aus Biopsien mit positivem Nodalstatus und dem CSS. In diesem kleinen Kollektiv (n=54) fällt auf, dass keiner der fünf als HER-2-positiv klassifizierten Patienten tumorbedingt verstorben ist - im Gegensatz zu den Patienten mit negativem HER-2-Status.

### 3.8.2 Korrelation des HER-2-Status aus Tumorgewebe nach Rektumresektion mit dem DFS und CSS

Die Korrelation des HER-2-Status aus Karzinom-Resektaten ergab folgende Aspekte:

#### Tumorfrees Gesamtüberleben

In Bezug auf das tumorfreie Überleben (s. Abbildung 18) über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 150 Monaten zeigt die Korrelation mit dem HER-2-Status aus Resektaten keine Signifikanz ( $p=0.1$ ). Auf Grund des kleinen Patientenkollektivs nach 90 Monaten von 26 Patienten (10%) wurde ebenfalls die Korrelation des 5-Jahres-Gesamtüberlebens erfasst. Die 5-Jahres-Überlebensrate zeigt 69.6% bei Patienten mit positivem Rezeptorstatus und 64.8% mit negativem Rezeptorstatus ( $p=0.1$ ).

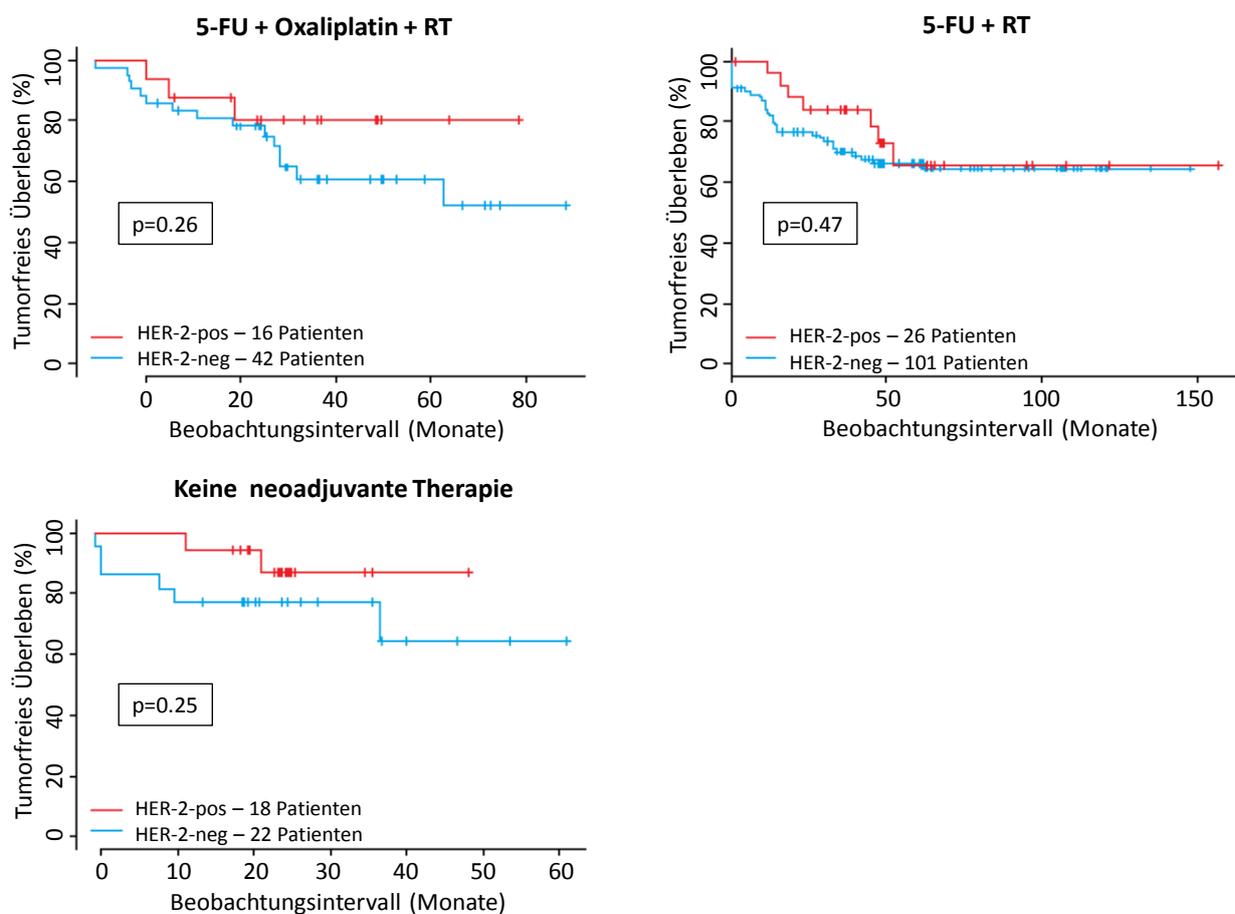


|           |     |    |    |    |   |           |     |     |     |    |    |    |    |
|-----------|-----|----|----|----|---|-----------|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| HER-2-pos | 60  | 31 | 11 | 5  | 2 | HER-2-pos | 60  | 54  | 39  | 26 | 19 | 11 | 6  |
| HER-2-neg | 159 | 91 | 49 | 21 | 5 | HER-2-neg | 159 | 130 | 107 | 81 | 60 | 49 | 34 |

**Abbildung 18: Tumorfreies 5-Jahres- und 12.5-Jahres-Überleben im Vergleich (n=225)**

In der linken Hälfte der Abbildung ist die Korrelation des HER-2-Status aus Resektaten mit dem DFS in einem Beobachtungsintervall von 150 Monaten dargestellt, während die rechte Hälfte der Abbildung den Nachsorgezeitraum von 80 Monaten erfasst. Das 5-Jahres-Überleben zeigt ein DFS von 69.6% bei HER-2-positiven Patienten und ein DFS von 64.8% bei HER-2-negativen Patienten (jeweils  $p=0.1$ ).

Bei separater Betrachtung der verschiedenen Therapieschemata zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei Korrelation des HER-2-Status mit dem tumorfreien Überleben. Es ist jedoch ein deutlicher Trend der HER-2-positiven Patienten zu einem längeren Gesamtüberleben in der primär operierten Patientengruppe und in dem intensiviert vorbehandelten Patientenkollektiv erkennbar (s. Abbildung 19).

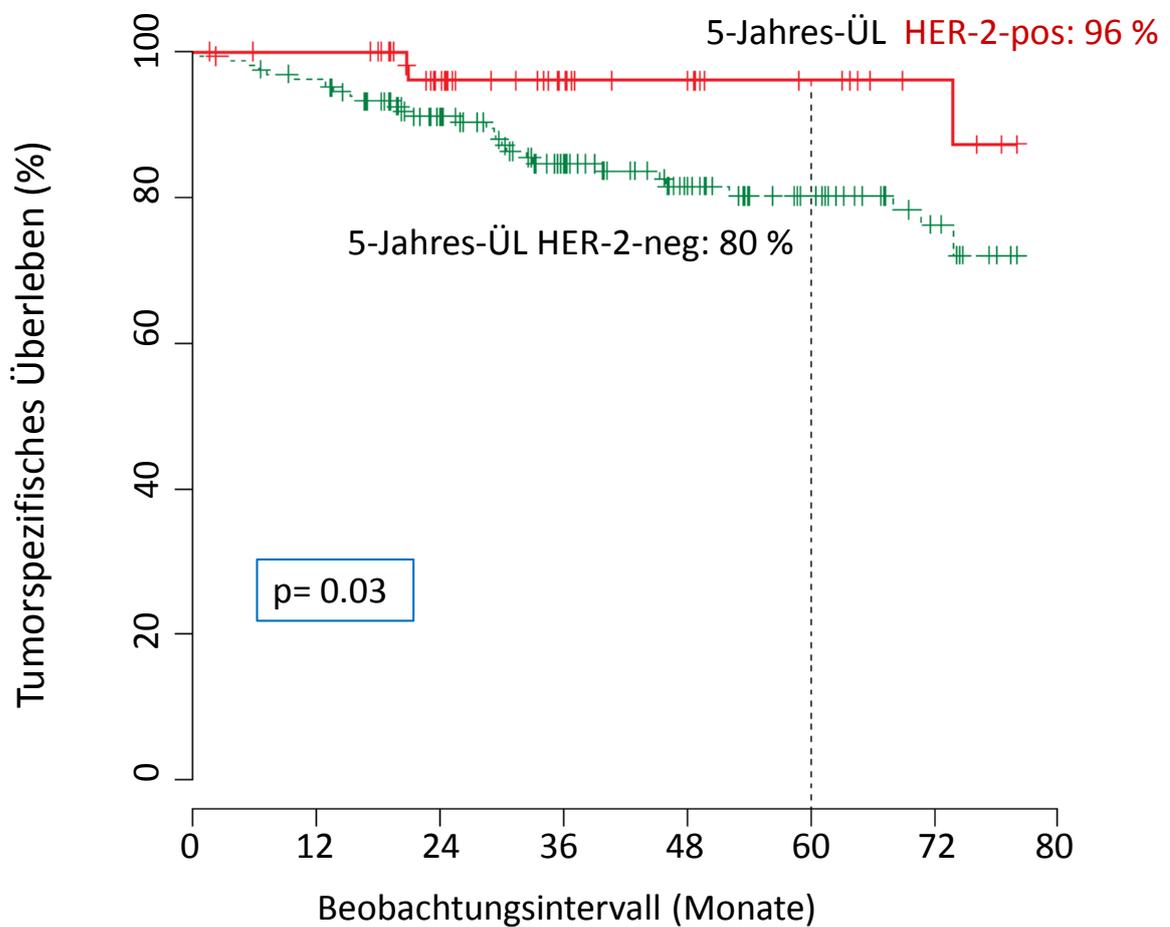


**Abbildung 19: Therapieschemata in Abhängigkeit des HER-2-Status und Korrelation mit dem DFS**

Sowohl das primär operierte Patientenkollektiv als auch das intensiviert vorbehandelte Patientenkollektiv weist bei HER-2-positiven Patienten einen deutlichen Trend zu einem erhöhten Gesamtüberleben auf.

## Tumorspezifisches Gesamtüberleben

Berücksichtigt man das Nachsorgeintervall von fünf Jahren, lässt sich ein signifikanter Unterschied darstellen ( $p=0.03$ ). Das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben betrug bei HER-2-positiven Patienten 96% und liegt damit signifikant höher als das Gesamtüberleben von 80% bei HER-2-negativen Patienten (s. Abbildung 20).



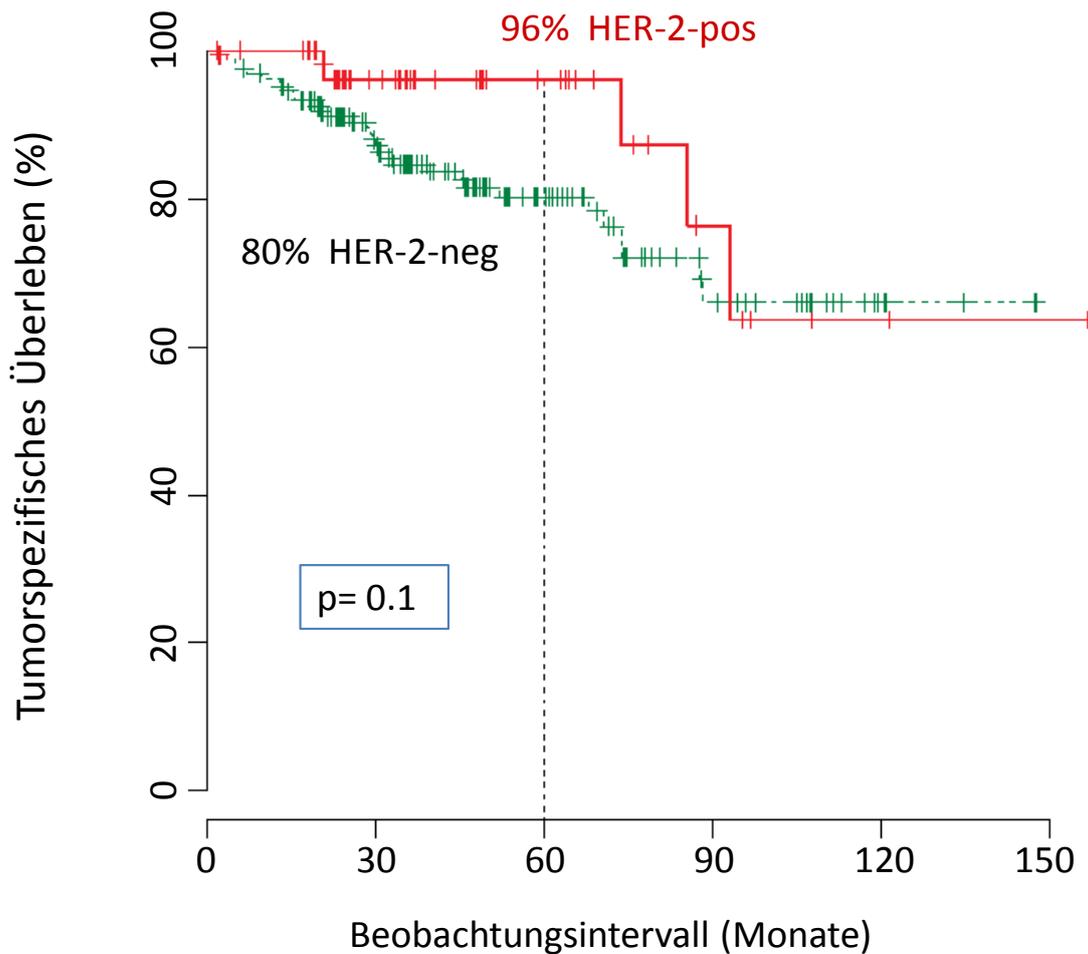
|           |     |     |     |    |    |    |    |
|-----------|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| HER-2-pos | 60  | 58  | 43  | 29 | 24 | 16 | 11 |
| HER-2-neg | 165 | 155 | 122 | 94 | 69 | 53 | 37 |

**Abbildung 20: Tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben (n=225)**

Während die Korrelation des HER-2-Status mit dem CSS in einem Intervall von 150 Monaten keine Signifikanz zeigt, ist hier in einem 5-Jahres-Verlauf ein signifikanter Unterschied darstellbar ( $p=0.03$ ). Das Kollektiv der

HER-2-positiven Patienten zeigt mit 96% ein deutlich verlängertes tumorspezifisches 5-Jahres-Überleben als das Subkollektiv der HER-2-negativen Patienten mit 80%.

Korreliert man nun den HER-2-Status mit dem CSS über ein Beobachtungsintervall von 150 Monaten, ergibt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0.1$ ). Allerdings liegt eine Follow-Up-Zeit von über 90 Monaten auch nur für 12% der Patienten ( $n=27$ ) vor (s. Abbildung 21).



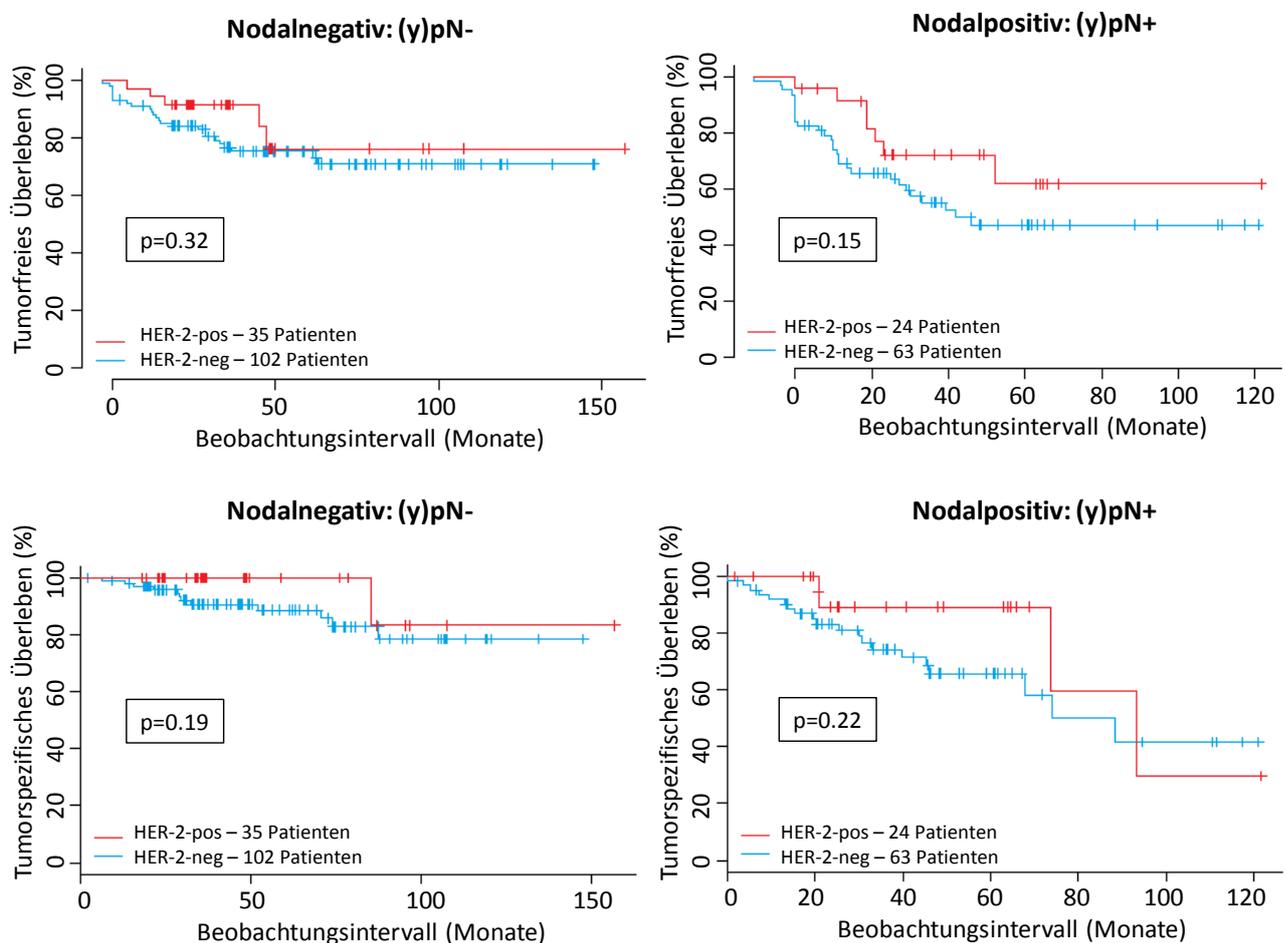
|           |     |     |    |    |   |
|-----------|-----|-----|----|----|---|
| HER-2-pos | 60  | 35  | 16 | 6  | 2 |
| HER-2-neg | 165 | 109 | 53 | 21 | 5 |

**Abbildung 21: Tumorspezifisches 12.5-Jahres-Überleben (n=225)**

Die Abbildung zeigt die Korrelation des HER-2-Status aus Resektaten mit dem tumorspezifischen Überleben in einem Langzeitverlauf von 150 Monaten. Es ist kein signifikanter Unterschied ( $p=0.1$ ) feststellbar.

### 3.9 Subgruppenanalyse: Korrelation des HER-2-Status mit dem DFS und CSS unter Berücksichtigung des Nodalstatus

Um das prognostische Potenzial von HER-2 weiter zu untersuchen, erfolgten Subgruppenanalysen mit Berücksichtigung des postoperativ histologisch erhobenen Nodalstatus. Das Gesamtkollektiv wurde in zwei Patientengruppen unterteilt, bei denen entweder ein negativer Nodalstatus (n=137) oder ein positiver Nodalstatus (n=87) nachgewiesen werden konnte. Die HER-2-Expression wurde mit dem DFS und CSS für die Subgruppen korreliert und das Ergebnis in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt (s. Abbildung 22).



**Abbildung 22: Subgruppenanalyse**

Die Abbildung zeigt Patienten-Subgruppen unter Berücksichtigung des Nodalstatus (137 Patienten waren postoperativ Nodal-negativ, 87 Nodal-positiv). Die HER-2-positiven Patienten zeigen zum Teil einen deutlichen Trend zu einem günstigeren Krankheitsverlauf vor allem im 5-Jahres-Nachbeobachtungsintervall.

Alle vier Kurven zeigten in dem Beobachtungsintervall von 10 Jahren keine signifikante Unterschiede im tumorfreien oder tumorspezifischen Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem HER-2-Status (Cox-Regressionsanalysen  $p < 0.05$ ).

Interessanterweise ist ein Trend zu einem verbesserten Gesamtüberleben (DFS und CSS) bei HER-2-positiven Patienten sowohl bei negativem als auch positivem Nodalstatus erkennbar. Das Vorhandensein von lokoregionären LK-Metastasen ist in der Regel mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs sowie Fernmetastasen und damit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert. Die Kurven der HER-2-negativen Patienten mit positivem LK-Status zeigen diesen Verlauf. Das tumorfreie 5-Jahres-Überleben der Nodal-positiven und HER-2-negativen Patienten beträgt ca. 50% versus ca. 70% der Nodal-negativen Patienten mit fehlender HER-2-Expression.

### 3.10 Univariate und multivariate Analysen

Zur Überprüfung, ob die HER-2-Expression einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellen kann, wurden univariate und multivariate Analysen mit dem Cox-Regressionsmodell unter Berücksichtigung der Parameter HER-2-Status, (y)pT-Status, (y)pN-Status, Resektions-Status und Therapieregime (keine neoadjuvante Therapie, RCT mit 5-FU und Oxaliplatin) für jeweils das tumorfreie und tumorspezifische Überleben durchgeführt (s. Tabelle 13).

Auf Grund der vorhandenen Überlebensdaten von nicht mehr als 12% (n=27) nach einem Nachsorgeintervall von über 150 Monaten lässt sich in diesem Zeitraum keine sinnvolle Aussage machen (s. Kapitel 3.8.2). Die multivariaten Analysen für den Zeitraum von bis zu 80 Monaten identifizieren sowohl den HER-2-Status ( $p=0.02039$ ) als auch den (y)pN-Status ( $p<0.00001$ ) sowie den Resektions-Status ( $p=0.0109$ ) als unabhängige Prognosefaktoren für das tumorspezifische Gesamtüberleben.

**Tabelle 13: Univariate und multivariate Analysen (Beobachtungsintervall 80 Monate)**

|  | Hazard Ratio (HR) | 95%- Konfidenz-Intervall |       | p-univariat*       | p-multivariat*      |
|--|-------------------|--------------------------|-------|--------------------|---------------------|
| <b><u>Parameter DFS</u></b>  |                   |                          |       |                    |                     |
| HER-2-Status   | 0.546             | 0.290                    | 1.029 | 0.11               | 0.062               |
| (y)pT-Status   | 1.327             | 0.915                    | 1.924 | <b>0.002</b>       | 0.136               |
| (y)pN-Status   | 1.736             | 1.257                    | 2.399 | <b>0.00002</b>     | <b>0.0008</b>       |
| Resektions-Status  | 2.423             | 1.246                    | 4.711 | <b>0.008</b>       | <b>0.009</b>        |
| Keine neoadjuvante Therapie  | 0.758             | 0.333                    | 1.727 | 0.75               | 0.51                |
| RCT (5-FU + Oxaliplatin)   | 1.507             | 0.853                    | 2.660 | 0.754              | 0.158               |
| <b><u>Parameter CSS</u></b>  |                   |                          |       |                    |                     |
| HER-2-Status   | 0.242             | 0.073                    | 0.803 | <b>0.044</b>       | <b>0.02</b>         |
| (y)pT-Status   | 1.399             | 0.824                    | 2.375 | <b>0.0063</b>      | 0.214               |
| (y)pN-Status   | 2.744             | 1.754                    | 4.292 | <b>&lt;0.00001</b> | <b>&lt; 0.00001</b> |
| Resektions-Status  | 2.932             | 1.282                    | 6.709 | <b>0.007</b>       | <b>0.011</b>        |
| Keine neoadjuvante Therapie  | 0.781             | 0.224                    | 2.724 | 0.086              | 0.699               |
| RCT (5-FU + Oxaliplatin)   | 1.325             | 0.578                    | 3.038 | 0.093              | 0.506               |
| *p-multivariat und p-univariat wurden mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet |                   |                          |       |                    |                     |

## 4 Diskussion

HER-2 oder HER-2/neu ist ein Transmembranrezeptor und Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren. Als therapeutisches *Target* ist der Rezeptor in einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorentitäten exprimiert und besonders seit 2000 im Mammakarzinom und aktuell auch im Magenkarzinom (Zulassung im metastasierten Stadium 2010) als prognostischer Biomarker bekannt.

Wie bereits in der aktuellen Publikation der vorliegenden Studie dargestellt (Conradi und Styczen et al. 2012), wurden in der Arbeit insgesamt 264 Patienten und korrespondierendes Biomaterial aus prätherapeutischen Biopsien und Resektaten untersucht. Die Studie ist die bis dato einzige Analyse von HER-2 im lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (Stadium cUICC-II und -III), die zur Charakterisierung des HER-2-Status sowohl die IHC als auch die ISH analog zu den Kriterien des Magenkarzinoms verwendet.

### 4.1 Expressions- und Genamplifikationsmuster von HER-2 beim Rektumkarzinom

Für die Bestimmung der Expressions- und Genamplifikationslevel von HER-2 waren 169 prätherapeutische Biopsien und 225 Rektumkarzinomresektate für die Färbung mittels IHC und ISH zugänglich. Die Auswertung erfolgte mittels eines Scores, der bereits in der großen, multizentrischen und randomisierten ToGA-Studie für Adenokarzinome des Magens und Karzinome des gastroösophagealen Übergangs angewandt wurde und sich damit für Karzinome des Gastrointestinaltraktes etabliert hat.

Die Ergebnisse zeigten einen positiven HER-2-Rezeptorstatus von 12.4% in den analysierten Biopsien und 26.7 % in den Rektumresektaten. Interessanterweise lag die Positivitätsrate bei primär operierten Patienten in den Resektaten (n=40) mit 45% deutlich höher als bei den neoadjuvant therapierten Patienten (23%; n=185). Während in den Biopsien ein positiver HER-2-Status von 21% (n=52) in dem Patientenkollektiv nach intensiver Vorbehandlung (RCT mit 5-FU und Oxaliplatin) nachgewiesen werden konnte, lag ein positiver HER-2-Status in dem primär operierten Patientenkollektiv bei nur 14% (n=3) vor.

Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit anderen Studien, bei denen jedoch zu HER-2 im Rektumkarzinom bislang nur die IHC als Methodik Anwendung gefunden hat. Unter der alleinigen Anwendung der IHC ohne den hier verwendeten Score ergeben sich neben einer variablen Detektion von HER-2 sehr heterogene Resultate, sodass auf Grund der Methodik und des verwendeten Auswertungs-Algorithmus kein direkter Vergleich möglich ist.

Drebber et al. (2011) detektierten eine HER-2-Überexpression von 27% (Score 2 und 3) in den Biopsien (membranöse Färbung) aus einem Kollektiv von insgesamt 54 Patienten mit primärem Rektumkarzinom, welche mit einer neoadjuvanten RCT behandelt wurden. Dabei wurde neben der membranösen Färbung auch die zytoplasmatische Färbung von HER-2 im Tumor miteinbezogen und beurteilt. Auf eine Detektion des HER-2-Genstatus wurde verzichtet.

Andere Untersuchungen an Rektumkarzinomen zeigen eine große Spannweite der HER-2-Positivität von 10% bis 38% (Kluftinger et al. 1992; Liming et al. 2011). Diese Differenz ist ebenfalls auf die unterschiedliche Methode für IHC, Antikörper und Scoring-Kriterien zur Charakterisierung des HER-2-Status zurückzuführen.

Weiterhin zeigt die IHC-Auswertung, dass die HER-2-Expression im Rektumkarzinom (in den Biopsien und in den Rektumkarzinomresektaten) der Expression beim Magenkarzinom ähnelt. Insbesondere die Heterogenität oder fokale Ausprägung des HER-2-Proteins im Rektumkarzinom lässt sich im intestinalen Typ des Magenkarzinoms beobachten (Rüschoff et al. 2010). Zusammenfassend empfiehlt es sich also, bei der IHC-Auswertung in Rektumkarzinomen oder KRK die HER-2-Test-Richtlinien des Magenkarzinoms anzuwenden.

### **HER-2-Positivität in Subgruppen**

Die hohe HER-2-Expression, gemessen in den Resektaten, in der Gruppe der primär Operierten (45%, n=40) versus die HER-2-Expression des vorbehandelten Kollektivs (23%, n=185) ist ein interessantes Resultat dieser Studie. Es wäre wünschenswert, weitere Studien durchzuführen, um dieses Ergebnis zu überprüfen. In weiteren Untersuchungen ist zu zeigen, ob dieser signifikante Unterschied zum einen auf eine mögliche *Downregulation* von HER-2 durch die neoadjuvante multimodale Chemo- und Radiotherapie zurückzuführen ist oder zum anderen auf eine RCT-induzierte Tumorregression. Unter Zunahme der Tumorregression in den Rektumresektaten vorbehandelter Patienten könnte die Zellanzahl, die für eine suffiziente Auswertung des HER-2-Status notwendig ist ( $\geq 10\%$  der Karzinomzellen mit positiver Membranfärbung), nicht ausreichend sein.

Die Annahme, dass die neoadjuvante RCT für eine *Downregulation* von HER-2 verantwortlich sein kann, wird dadurch bestärkt, dass entgegen dem Befund in der prätherapeutischen Biopsie mit einem positivem HER-2-Status im korrespondierenden Rektumkarzinomresektat ein negativer HER-2-Status bei insgesamt 6 Patienten (5%) zu verzeichnen war. Diese Patienten wurden ausnahmslos mit einer RCT behandelt. Eine solche RCT-induzierte mutmaßliche *Downregulation* von HER-2 ist bereits beim Mammakarzinom in mehreren Studien beschrieben worden (Piper et al. 2004; Pedrini et al. 2011; Skalova et al. 2011). Ergebnisse von Pedrini et al. (2011) zeigten eine Änderung der HER-2-Expression zu einem negativen HER-2-Status bei 18% der Patientinnen (n=90) mit Mammakarzinom nach applizierter neoadjuvanter CTx (Doxorubicin und Cyclophosphamid). Die Funktionsweise dieses Mechanismus auf molekularer Ebene ist jedoch bislang nicht ausreichend geklärt.

Ein weiterer Hinweis auf eine mutmaßliche *Downregulation* von HER-2 könnte eine erhöhte HER-2-Expression in den präoperativen Biopsien versus die Resektate der vorbehandelten Kohorte sein. Dies ist in den hier dargestellten Ergebnissen nicht der Fall (s. Tabelle 10) und mag auf die Heterogenität der HER-2-Färbung in der IHC zurückzuführen sein (s. Kapitel 3.6), sodass eine Biopsie eines Patienten für die Detektion des HER-2-Status nicht ausreichend ist.

Demgegenüber steht die These, dass die RCT-induzierte Tumorregression zu einer Abnahme der Expression in den Resektaten resultiert: Die neoadjuvante Therapie hat zu einer deutlichen Tumorregression (52% TRG 3 und 8% TRG 4 in Kollektiv B; 63% TRG 3 und 8% TRG 4 in Kollektiv C) in Rektumkarzinomresektaten geführt. Dadurch konnte ein T-Level-*Downsizing* bei insgesamt 96 Patienten (44%) und ein UICC-*Downstaging* bei insgesamt 115 Patienten (53%) des neoadjuvant behandelten Subkollektivs erreicht werden. Auch der Tumorregressionsgrad in der Unterteilung nach dem HER-2-Status zeigte eine deutliche Regression des Tumors bei 53% der HER-2-negativen Patienten versus 37% der HER-2-positiven Patienten. Eine mögliche Ursache liegt in der zum Teil sehr ausgeprägten Tumorregression nach neoadjuvanter RCT. In Präparaten, die nur noch wenige vitale Tumorzellen enthalten, ist HER-2 bei der beobachteten Heterogenität des Expressionsmusters dann unter Umständen seltener zu detektieren und die Rate HER-2 positiver Fälle geringer.

Zusammenfassend lässt sich nur vermuten, welcher Mechanismus zu der signifikant höheren HER-2-Positivität der nicht-vorbehandelten Gruppe führt. Die Tatsache, dass eine *Downregulation* von HER-2 in anderen Tumorentitäten beschrieben ist und intensiv an dem molekular-genetischem Mechanismus der Interaktion von HER-2 mit Chemotherapeutika geforscht wird (Bertotti et al. 2011; Spears et al. 2012; Hubalek et al. 2010), lässt die Bedeutung von HER-2 im Rahmen multimodaler Therapiestrategien erahnen.

## 4.2 HER-2 als histopathologischer Biomarker

HER-2 kann auf Grund der hohen Positivitätsrate in intratumoralen Präparaten auch im Rektumkarzinom als histopathologischer Biomarker angewandt werden.

Eine einzelne prätherapeutische Biopsie eines Patienten reicht für die Diagnosestellung des HER-2-Status jedoch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht aus. Dies zeigte sich durch das Ergebnis bei dem Vergleich des HER-2-Status der Biopsie mit dem korrespondierenden Resektat, in dem in einem Fünftel der Fälle die Biopsie negativ und das korrespondierende Resektat HER-2-positiv befundet wurden. Bei der Bestimmung des HER-2-Status beim Magenkarzinom gilt die Empfehlung zur Entnahme und Testung von 6-8 Biopsien, um ein verlässliches Ergebnis zu erzielen (Rüschoff et al. 2010).

Auf Grund der ähnlichen Färbeeigenschaften und Expression von HER-2 im Magenkarzinom und Rektumkarzinom muss dies vermutlich auch für Probenentnahmen des Rektumkarzinoms empfohlen werden. Die Auswertung des HER-2-Status aus dem residuellen Tumor sollte jedoch ebenfalls erfolgen, um eine zeitnahe postoperative Revalidierung des HER-2-Status unter Einschluss kliniko-pathologischer Parameter durchzuführen. Der postoperative HER-2-Status könnte somit zur Stratifizierung/Adaptation der adjuvanten Therapie führen; insbesondere bei Patienten, die HER-2-positiv und Nodal-positiv sind (s. Kapitel 4.5). Das Resektat bietet im Vergleich zu einer Biopsie hinsichtlich der Tumormasse genügend Material für eine Färbung und eine valide Auswertung. Die immunhistochemische Untersuchung ist ein kosteneffizientes Verfahren, welches nach Färbung der Präparate in kürzester Zeit auswertbar ist. Mit Hilfe der "magnification rule" (oder "Objektivregel"; s. Kapitel 2.8.3) und dem verwendeten Algorithmus lässt sich der HER-2-Status uneingeschränkt objektiv und reproduzierbar ermitteln. Die Regelung des Testalgorithmus beim Magenkarzinom, bei 2.5-facher und 5-facher Vergrößerung den IHC Score 3+ zu werten (Bang et al. 2010; Rüschoff et al. 2010), wurde in dieser Studie dahingehend modifiziert, dass IHC 3+ nur bei einer 2.5-fachen Vergrößerung eine sichere Klassifizierung des HER-2-positiven Status aus der IHC allein zulässt. Mittelmäßig bis starke Färbeintensitäten in 5-facher Vergrößerung können in Abhängigkeit von der Qualität des verwendeten Lichtmikroskops zu falsch-positiven Resultaten führen, sodass diese - zusammen mit Färbeintensitäten in 10- bis 20-facher Vergrößerung - als IHC 2+ zu werten sind. Es ist nachgewiesen, dass die Proteinexpression von HER-2 vor allem durch einen gesteigerten Gen-Polymorphismus verursacht wird (Hynes und Stern 1994; Hung et al. 1986), sodass die ISH für die Beurteilung dieser grenzwertigen IHC-Befunde (IHC 2) obligat zu sein scheint. Dabei ist die FISH, welche besonders beim Mammakarzinom Anwendung gefunden hat, der chromogen-basierten ISH (CISH) äquivalent (Akhdar et al. 2011).

In der Literatur sind alternative Methoden zur Detektion des HER-2-Status beschrieben worden. Dazu gehört die Bestimmung der extrazellulären Domäne von HER-2 im Serum und die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (Q-RT-PCR). Resultate aus Analysen beim Mammakarzinom zeigten eine hohe Korrelation des Serumlevels mit dem bekannten IHC/FISH-Test. Diese Methodik jedoch birgt vielmehr einen therapeutischen

Nutzen und ein Therapie-Monitoring als die Funktion eines diagnostischen Markers (Kuroda et al. 2010; Molina et al. 2012).

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) konnte in Studien beim Mammakarzinom eine verlässliche, schnelle und kostengünstige Alternative mit hoher Konkordanz zu den IHC/FISH Resultaten aufzeigen (Cuadros et al. 2010; Barberis et al. 2008; Rosa et al. 2009; Kulka et al. 2006). In der klinischen Routine hat sie sich jedoch bisher nicht wie die IHC/FISH oder die derzeit vermehrt in Einsatz tretende CISH (*chromogenic-in-situ-hybridization*) etablieren können und wird nur experimentell und zu Forschungszwecken angewandt. Auf Grund der Notwendigkeit von tief gekühlten Präparaten und Mikrodissektions-Prozeduren zur Ermittlung des HER-2-Genstatus mittels PCR wird vermutlich auch in Zukunft die seit Jahren in der Routine beim Mamma- und Magenkarzinom etablierte Methodik der IHC und CISH Bestand haben. Somit erscheint die IHC/CISH auch beim Rektumkarzinom die Methodik der Wahl zur Detektion des HER-2-Status zu sein.

#### **4.3 Prognostische Relevanz der HER-2-Überexpression und HER-2-Genamplifikation hinsichtlich des Gesamtüberlebens**

Die Resultate in der vorliegenden Studie konnten einen signifikanten Vorteil für HER-2-positive Patienten - gemessen in Rektumkarzinomresektaten - im CSS nachweisen (5-Jahres-Überleben bei HER-2-positiven Patienten 96% versus 80% bei HER-2-negativen Patienten;  $p=0.03$ ). Die Korrelation der prätherapeutischen Biopsien mit dem CSS und DFS sowie Korrelationen des HER-2-Expressionslevels mit weiteren kliniko-pathologischen Parametern wie TRG, UICC-Stadium und Nodalstatus ergaben keinen Zusammenhang. Jedoch konnten multivariate Analysen unter Berücksichtigung von pT-Status, pN-Status, Resektions-Status und Behandlungsschema (keine neoadjuvante Therapie und neoadjuvant 5-FU+RT) HER-2 als unabhängigen prognostischen Faktor identifizieren ( $p=0.02$ ).

Prognostische Daten der HER-2-Proteinexpression und -Genamplifikation sind speziell beim Rektumkarzinom widersprüchlich. Während Drebber et al. (2011) ebenfalls eine membranöse HER-2-Positivität in Rektumkarzinom-Proben nachweisen konnten, ergab nur die Korrelation der zytoplasmatisch gemessenen HER-2-Expression einen signifikanten Überlebensvorteil ( $p=0.023$ ).

Dieses Resultat kann nur als statistische Korrelation ohne kausalen Zusammenhang erklärt werden, da nach den standardisierten Hercep-Test-Richtlinien und FDA-genehmigten Scoring-System (Graziano 1998) nur eine immunhistochemisch nachgewiesene membranöse Färbung die Klassifikation des HER-2-Status zulässt.

Park et al. (2007) konnten HER-2 ebenfalls als unabhängigen prognostischen Faktor detektieren. Patienten (N=137) mit KRK und hoher HER-2-Expression zeigten eine signifikant höhere postoperative Rezidivrate ( $p=0.013$ ) und eine signifikant verkürzte Überlebenszeit nach 5 Jahren (55.1% vs. 78.3%;  $p<0.05$ ). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei Kolon- und Rektumkarzinomen um verschiedene Tumorentitäten handelt und diese möglicherweise nicht direkt verglichen werden dürfen (Hong et al. 2012).

Weitere Untersuchungen zum KRK oder speziell zum Rektumkarzinom sind in ihrer Anzahl limitiert und bezüglich der Methodik sehr heterogen. Insgesamt zeigten diese Resultate keine Assoziation des HER-2-Status mit kliniko-pathologischen Parametern oder dem Überleben (Kluftinger et al. 1992; Kruszewski et al. 2010; Marx et al. 2010; Liming et al. 2011).

#### **4.4 Vergleich des prognostischen Potentials von HER-2 in weiteren Tumorentitäten**

HER-2 ist als Wachstumsfaktor in der Regulation und Kontrolle von Zellprozessen (Zellwachstum, Differenzierung und Zellmigration) sowie an der Entstehung und Progression von verschiedenen Tumorentitäten beteiligt (Slamon et al. 1989).

Speziell beim Mamma- und Magenkarzinom ist die HER-2-Überexpression mit einem progressiveren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose assoziiert (Dowsett et al. 2009; Gravalos und Jimeno 2008). Auch in der bisherigen Studienlage zum Pankreaskarzinom zeigt sich eine HER-2-Positivitätsvarianz von 16-69% (Lei et al. 1995; Koka et al. 2002; Saxby et al. 2005). Auch hier ist HER-2 als prognostischer Biomarker identifiziert worden, der bei Überexpression mit einer verkürzten Überlebenszeit signifikant korreliert (Komoto et al. 2009; Lei et al. 1995; Yamanaka et al. 1993).

Die Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu dieser Arbeit. Obwohl es bislang keinerlei Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus für das verbesserte klinische *Outcome* der HER-2-positiven Patienten gibt, finden sich dennoch Studien, die vergleichbare Ergebnisse auch in anderen Tumorentitäten beobachtet haben.

In einer aktuellen Studie zur Erforschung von HER-2 im kurativ resezierten Adenokarzinom des Ösophagus (N=713) wurden die Patienten mittels IHC und FISH analog der Klassifikation untersucht, die bereits in der ToGA-Studie etabliert und auch in dieser Studie beim Rektumkarzinom verwendet wurde (Yoon et al. 2012). Dabei zeigte sich eine HER-2-Positivitätsrate von insgesamt 17%. Weiterhin korrelierte der positive HER-2-Status aus AEG mit anliegendem Barrett-Ösophagus mit einem signifikant verbesserten DFS ( $p=0.0067$ ) und OS ( $p=0.002$ ). HER-2-positive Patienten zeigten mit 35% ein signifikant besseres 5-Jahres-Gesamtüberleben als HER-2-negative Patienten (26% OS;  $p=0.024$ ).

Ähnliche Beobachtungen zeigen Daten aus der ToGA-Studie beim lokal fortgeschrittenen Magenkarzinom (Bang et al. 2010). Patienten mit starker HER-2-Expression (IHC 3+/IHC 2+ und FISH-positiv), die mit alleiniger CTx (ohne Trastuzumab) therapiert wurden, zeigten in post-hoc-Analysen ein deutlich besseres OS als Patienten mit geringer HER-2-Expression (medianes Gesamtüberleben 11.8 Monate versus 8.7 Monate). In der Literatur findet sich ebenfalls beim Mammakarzinom ein nachgewiesener prognostischer Benefit für HER-2-positive Patienten (Alexe et al. 2007). In Nodal-negativen und HER-2-positiven Mammakarzinomen wurde ein Subtyp identifiziert, welcher mit einer Überexpression von lymphozytär-assoziierten Genen und damit einhergehender histologischer Immunzellinfiltration assoziiert war und eine erhebliche Verbesserung der Prognose aufzeigen konnte ( $p=0.01$ ; 89% Metastasen-freies Überleben des Subtyps mit lymphozytären Infiltraten versus 42% Metastasen-freies Überleben der HER-2-positiven Fälle ohne Immunzellinfiltration). Interessanterweise sprach dieser Subtyp exzellent mit einer hohen Rate an kompletter pathologischer Remission des Tumors auf die neoadjuvante Behandlung mit Trastuzumab an (Alexe et al. 2007; Pupa et al. 1996). Die Anwesenheit der spezifischen Immuninfiltrate und Assoziation mit besserer Prognose ist unter anderem auch in KRK beschrieben worden (Pages et al. 2005; Galon et al. 2006). Auch im Rektumkarzinom kann möglicherweise für Patienten, sofern cNO und HER-2-positiv, die neoadjuvante RCT mit additiver Gabe von Trastuzumab zu einer erhöhten pCR-Rate führen.

Die Interaktion des HER-2-Gens mit der Biologie von Tumorzellen, einschließlich des Einflusses auf die lymphozytär-assoziierten Gene und inflammatorischen Signalzytokine, ist bislang nicht ausreichend erforscht und stellt nur eine mögliche Erklärung für das Resultat des verbesserten Überlebens der HER-2-positiven Patienten dar. Inwieweit dieser Mechanismus auch im Rektumkarzinom detektiert werden kann, muss in weiteren Studien mit höheren Fallzahlen und additiver Methodik zur Gensequenzierung analysiert werden.

#### **4.5 Anti-HER-2-Therapien: klinische Relevanz und Ausblick**

Anti-HER-2-Substanzen sind bereits in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms, des metastasierten Magenkarzinoms und Karzinoms des gastroösophagealen Übergangs von der FDA zugelassen und in der klinischen Routine etabliert. Anti-HER-2-Antikörper wie beispielsweise Trastuzumab (Herceptin), der gegen die extrazelluläre Domäne des Transmembranrezeptors HER-2 gerichtet ist (Hudis 2007), zeigte in bisherigen Studien ein exzellentes Ansprechen auf HER-2-positive Mamma- und Magenkarzinome mit einem signifikanten Überlebensvorteil gegenüber HER-2-positiven Patienten mit alleiniger CTx (Piccart-Gebhart et al. 2005; Romond et al. 2005; Bang et al. 2010), sowie den Vorteil einer Kosten-Effizienz (Shiroiwa et al. 2011) mit relativ geringer Therapie-assoziiierter Toxizität (Bang et al. 2010; Fujimoto-Ouchi et al. 2007).

Die Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren, zu deren Mitgliedern der HER-2-Rezeptor zählt, und ihre nachgeschalteten Signalwege sind in die Karzinogenese und Progression des KKRK involviert (Spano et al. 2005) und bei EGFR-Überexpression mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Resnick 2004).

Anti-EGFR-Antikörper (unter anderem Cetuximab) werden bereits seit 2004 (FDA-Zulassung) in der Klinik zur individualisierten Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK), welches EGFR-Rezeptoren exprimiert und auf eine vorherige Irinotecan-haltige Therapie nicht anspricht, eingesetzt (Cunningham et al. 2004). Nachfolgende Studien haben Cetuximab-resistente KKRK untersucht, die in einer Mehrzahl der Fälle mit einer Mutation des KRAS-Gens einhergingen. Die Mutation ist mit einer nachweislichen Aktivierung der EGFR-Signaltransduktionswege assoziiert (Lievre et al. 2008; Van Cutsem et al. 2009).

Interessanterweise konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie die HER-2-Überexpression und -Genamplifikation im Tiermodell (mit *Xenopatients*) als negative Determinante neben der KRAS-Mutation für das Ansprechen auf Anti-EGFR-Antikörper im mKRK identifiziert werden (Bertotti et al. 2011). Bei 13.6% Patienten mit einem Cetuximab-resistenten mKRK, das keine KRAS-Mutation aufwies (KRAS-Wildtyp), fand sich demnach eine HER-2-Genamplifikation. Weiterhin untersuchte diese Studie an Hand von *Xenografts* (reseziertes Material aus Lebermetastasen von Patienten mit mKRK) und Implantation dieser in Mäuse (*Xenopatients*) die Bedeutung von HER-2 als *Target* für Anti-HER-2-Therapien. Insbesondere sollte dabei geklärt werden, ob eine HER-2-Blockade die Sensitivität für Anti-EGFR-Therapien wiederherstellen könnte. Dazu wurden die Cetuximab-resistenten KRK der *Xenopatients* mittels verschiedener Konstellationen mit Inhibitoren von HER-2 und EGFR (Lapatinib, Cetuximab, Pertuzumab) behandelt. Lapatinib repräsentiert die Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) und bindet selektiv an HER-2 und EGFR. Pertuzumab ist wie auch Cetuximab ein monoklonaler Antikörper, der die Interaktion der Heterodimerisierung zwischen HER-2 und anderen EGFR stört (beispielsweise HER-3). Es zeigte sich, dass die Subtypen mit der Kombinationstherapie aus Lapatinib und Pertuzumab sowie Lapatinib und Cetuximab eine signifikante Tumorreduktion (-75% bei Pertuzumab und Lapatinib; -41% bei Cetuximab und Lapatinib) und einen stabilen Krankheitsverlauf erzielten im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit Lapatinib oder alleinigen Therapie mit Pertuzumab.

Demnach bestätigte sich die Vermutung, dass HER-2 ein positiver Biomarker für das Ansprechen einer Anti-HER-2-Therapie ist und duale Anti-HER-2- und Anti-EGFR-Substanzen (Lapatinib und Pertuzumab) zu einer Tumorregression führen können.

Es lässt sich nun diskutieren, ob diese positiven Resultate der Studie mit *Xenopatients* unmittelbar auf ein klinisches *Setting* übertragbar sind. Unabhängig von diesen Resultaten waren weitere Analysen (Yonesaka et al. 2011) und eine klinische Phase-II-Studie ebenfalls mit den vorgestellten Resultaten konsistent: DUX-Studie (Weickhardt et al. 2012). Weickhardt et al. (2012) konnten nachweisen, dass die duale Inhibition von EGFR mit Cetuximab und Erlotinib (TKI ähnlich dem Laptinib) im mKRK die Ansprechrates und das Überleben nicht nur deutlich verlängert (31% und 12.1 Monate OS retrospektiv), sondern sogar das *Progression-free-survival* ("Progressions-freie-Zeit") im Vergleich zu Therapien mit alleiniger Behandlung mit Cetuximab verdoppelt (Jonker et al. 2007; Karapetis et al. 2008).

---

Bei Tumoren mit dem KRAS-Wildtyp zeigte sich eine noch gesteigerte Ansprechrate von 41% und ein OS von 12.9 Monaten.

HER-2 und die duale Blockade von HER-2/EGFR sind demnach wichtige Angriffspunkte in der individualisierten Therapie von mKRK. Es gilt zu klären, inwieweit diese Ergebnisse aus den Studien des mKRK auch speziell für das (lokal fortgeschrittene) Rektumkarzinom übertragen werden können.

Überdies stellt sich die Frage, ob Patienten mit HER-2-Expression und -Genamplifikation im Rektumkarzinom, die in dieser vorliegenden Arbeit ein signifikant verbessertes Überleben zeigten, auf eine Anti-HER-2-Therapie beispielsweise mit Trastuzumab (wie bei der Behandlung des Mamma- oder Magenkarzinoms) oder mit der Kombinationstherapie aus Anti-EGFR/HER-2-Antikörpern profitieren könnten. Aus den Resultaten der bisherigen Literatur ist die Tendenz zu einem noch günstigeren Langzeitüberleben durchaus denkbar.

Besonders könnten dabei HER-2-positive Patienten profitieren, die bereits einen positiven Lymphknotenbefall aufweisen. Nodal-positive Patienten haben im Vergleich zu Nodal-negativen Patienten ein signifikant schlechteres tumorfreies Überleben (Gaedcke und Liersch et al. 2011). Innerhalb der Subpopulation der Patienten mit LK-Metastasen zeigt auch die vorliegende Arbeit, dass die HER-2-positiven Patienten im Vergleich zu den HER-2-negativen Patienten einen Trend zu einem günstigeren Krankheitsverlauf, insbesondere im 5-Jahres-Nachbeobachtungsintervall aufweisen (CSS: ca. 90% HER-2-positiv versus ca. 70% HER-2-negativ; DFS: ca. 65% HER-2-positiv versus ca. 50% HER-2-negativ). Somit könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass für HER-2-positive und Nodal-positive Patienten nach einer adjuvanten CTx unter additiver Gabe von Trastuzumab das Risiko für die Entwicklung von Tumorrezidiven gesenkt werden könnte. Dies müsste im Rahmen klinischer Studien überprüft werden.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Resultate ein interessantes klinisches Potential von HER-2 und Anti-HER-2-Therapien. Zukünftig bedarf es prospektiv, randomisierter klinischer Studien, die Anti-HER-2-Substanzen wie Trastuzumab im lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom oder auch kombinierte Antikörper wie Cetuximab und Erlotinib (oder Lapatinib) zunächst bei Patienten in palliativer Intention untersuchen.

## 4.6 Tumorbiologie von HER-2 und EGFR

Die Untersuchung der Interaktion von HER-2 und anderen EGFR, speziell mit dem Wachstumsfaktor HER-3, ist Gegenstand aktueller Forschung.

HER-3 konnte in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom (Tanner B et al. 2006), im Melanom (Reschke et al. 2008), im Bronchialkarzinom (Sithanandam et al. 2005), einschließlich dem KRK (Beji et al. 2012) als prognostischer Marker für ein reduziertes Überleben identifiziert werden.

In Studien zur molekularen Analyse der EGFR-Signalwege im Mammakarzinom konnte die Heterodimerisierung von HER-2/HER-3 als einer der potentesten mitogenen Komplexe detektiert werden, der zu einer malignen Zelltransformation führt (Van der Horst et al. 2005). Ebenfalls postulieren weitere Autoren (Yonesaka et al. 2011; Laurent-Puig et al. 2012), dass die Inhibition dieser HER-2/HER-3-Heterodimerisierung durch TKI wie Lapatinib die Sensitivität einer Anti-EGFR-Therapie *in vitro* und *in vivo* wiederherstellen kann.

Somit ist neben der beschriebenen HER-2-Genamplifikation in Cetuximab-resistenten mKRK (Bertotti et al. 2011) auch die Hochregulation des HER-3-Liganden Heregulin ein Mechanismus, der zu einer Resistenz gegen eine Anti-EGFR-Therapie führen kann (Laurent-Puig et al. 2012). Weiterhin konnten Sergina et al. (2007) bei HER-2-überexprimierenden Mammakarzinomen nachweisen, dass nach alleiniger Behandlung mit einem TKI die HER-3-Expression kompensatorisch anstieg mit einer nachfolgenden Aktivierung der Signaltransduktionswege.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Daten, dass die separate Betrachtung des Biomarkers HER-2 nicht ausreichend ist. Die Analyse der Interaktion von HER-2 mit HER-3 und weiteren Mitgliedern der EGFR-Familie sowie die synergistische Blockade der induzierten Signalwege ist notwendig, um für den individuellen Patienten einen optimalen therapeutischen Benefit zu erzielen. Mittels verschiedener, simultan eingesetzter Antikörper könnte das Auftreten von Resistenzen gegen einzelne Antikörper limitiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Implementierung von multimodalen Behandlungsregimen, insbesondere der neoadjuvanten RCT, hat signifikant zu einer Reduktion der Lokalrezidivrate und Verbesserung der Prognose von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (cUICC II/III) geführt. Laufende klinische Studien richten ihren Fokus neben der Intensivierung der Therapie auch auf die Identifikation prädiktiver und prognostischer Biomarker sowie auf die Evaluation potenzieller neuer Therapie-*Targets*. In diesem Kontext wurde der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor HER-2 (Mitglied der EGFR-Familie) untersucht, dessen Rolle im (lokal fortgeschrittenen) Rektumkarzinom noch unklar ist. Diese Studie mit insgesamt 264 Patienten ist die bis dato einzige Analyse von HER-2 unter Berücksichtigung multimodaler Therapieregime im cUICC-II/III-Rektumkarzinom und unter Verwendung der Immunhistochemie sowie der Dual-In-Situ-Hybridisierung. Sämtliche Patienten erhielten eine standardisierte multimodale Therapie innerhalb oder analog zu den Studienprotokollen randomisierter Phase-II/-III-Studien der 'German Rectal Cancer Study Group'.

Der HER-2-Status wurde in 169 prätherapeutischen Biopsien sowie in 225 Rektumkarzinomresektaten mit Hilfe eines IHC-Scorings (IHC 0-3) ermittelt. Erstmals kam dabei ein IHC-Auswertungsalgorithmus zum Einsatz, der in der ToGA-Studie beim Magenkarzinom verwendet wurde und sich mittlerweile in der klinischen Routine etabliert hat. Die Detektion einer HER-2-Genamplifikation erfolgte dabei mittels Dual-ISH in IHC 2+ beurteilten Präparaten. Ein IHC 3+ Score oder eine Dual-ISH Ratio  $\geq 2.0$  wurden als HER-2-positiv klassifiziert. Die Ergebnisse wurden mit kliniko-pathologischen Parametern (u.a. Resektions-Status, postoperativer Nodalstatus (y)pN) und Langzeitüberleben korreliert.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des prädiktiven und prognostischen Potenzials von HER-2 sowie der Klärung, ob der Transmembranrezeptor HER-2 auch im Rektumkarzinom in relevanter Menge exprimiert wird und damit als potenziell therapeutisches *Target* in der Klinik und in multimodalen Therapieregimen von Bedeutung sein könnte.

Ein positiver HER-2-Status konnte in 12.4% der prätherapeutischen Biopsien (n=21) und in 26.7% der Rektumkarzinomresektate (n=60) detektiert werden. Bei einer medianen Follow-Up-Zeit von 46.5 Monaten zeigten Patienten mit HER-2-Positivität einen Trend zu einem verbesserten tumorfreien Überleben (DFS;  $p=0.1$ ) und ein signifikant verbessertes krankheitsspezifisches Gesamtüberleben (CSS;  $p=0.03$ ). Das 5-Jahres-Überleben betrug 96.0% (HER-2-positiv) versus 80.0% (HER-2-negativ). Multivariate Analysen identifizierten den HER-2-Status ( $p=0.02$ ) zusammen mit dem (y)pN-Status ( $p<0.00001$ ) und dem R-Status ( $p=0.01$ ) als einen unabhängigen Prognosefaktor für das CSS. Somit zeigen die durchgeführten Analysen, dass HER-2 auf Grund der hohen Positivitätsrate in intratumoralen Präparaten auch im Rektumkarzinom (wie auch im Mamma- und Magenkarzinom) als histopathologischer Biomarker Bedeutung haben kann. Das vorgestellte Resultat, dass ein HER-2-positiver Status mit einem signifikant verbesserten CSS assoziiert ist, deckt sich auch mit aktuellen Studien beim Magen- und Ösophaguskarzinom (Bang et al. 2010: ToGA-Studie; Yoon et al. 2012).

Für die Entwicklung neuer innovativer Therapien könnte HER-2 als viel versprechendes *Target* nach Validierung in einer noch größeren Patientenkohorte auch im Rektumkarzinom gelten. Insbesondere der Einsatz etablierter Anti-HER-2-Substanzen (z.B. Trastuzumab) und Nachfolgesubstanzen (wie TDM-1) oder die duale Inhibition von HER-2 und EGFR (Pertuzumab) könnte ein neuer Ansatzpunkt für die personalisierte onkologische Therapie des Rektumkarzinoms sein. Interessant ist ebenfalls die Untersuchung der Interaktion von HER-2 mit anderen Biomarkern, wie beispielsweise mit KRAS oder mit anderen EGFR-Mitgliedern (insbesondere HER-3). In prospektiven klinischen Studien sollte unbedingt untersucht werden, ob eine HER-2-Überexpression zu einer Resistenzentwicklung von Anti-EGFR-Therapien (z.B. Cetuximab) in metastasierten Stadien führt und ob HER-2 zukünftig zur Therapiestratifizierung und Optimierung der Therapie im Rektumkarzinom dienen könnte.

## 6 Anhang

### 6.1 TNM- und UICC-Klassifikationen

TNM-Klassifikation (modifiziert nach Wittekind und Meyer 2010, S. 96-97):

| <b>T-Status</b>   |   |
|-------------------|---|
| T1                | Infiltration der Submukosa                                  |
| T2                | Infiltration der Muscularis propia                          |
| T3                | Infiltration der Subserosa, nicht peritonealisiertes Gewebe |
| T4a               | Infiltration des viszeralen Peritoneums                     |
| T4b               | Infiltration anderer Organe oder Strukturen                 |
| <b>N-Status</b>   |   |
| N1a               | Metastasen in einem regionären LK                           |
| N1b               | Metastasen in 2-3 regionären LK                             |
| N1c               | Satellite(n) ohne regionäre LK-Metastasen                   |
| N2a               | Metastasen in 4-6 regionären LK                             |
| N2b               | Metastasen in $\geq 7$ regionären LK                        |
| <b>Metastasen</b> |   |
| M1a               | Fernmetastasen in einem Organ                               |
| M1b               | Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder Peritoneum      |

Stadieneinteilung nach UICC (modifiziert nach Wittekind und Meyer 2010, S. 98):

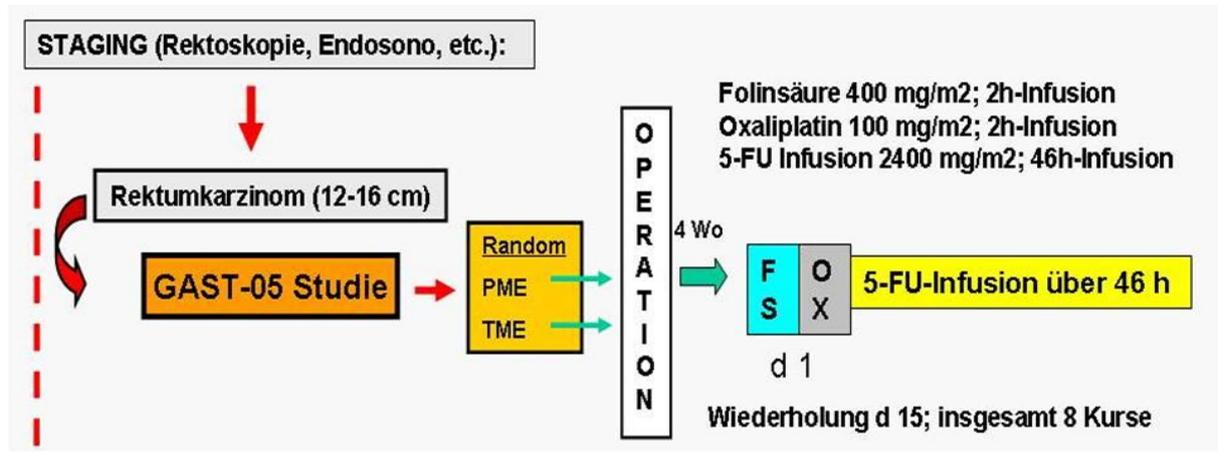
| <b>UICC</b>   | <b>T-Status</b> | <b>N-Status</b> | <b>Metastasen</b> |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Stadium 0     | Tis             | N0              | M0                |
| Stadium I     | T1, T2          | N0              | M0                |
| Stadium II A  | T3              | N0              | M0                |
| Stadium II B  | T4a             | N0              | M0                |
| Stadium II C  | T4b             | N0              | M0                |
| Stadium III   | Jedes T         | N1, N2          | M0                |
| Stadium III A | T1, T2          | N1a             | M0                |
|               | T1              | N2a             | M0                |
| Stadium III B | T3, T4a         | N1              | M0                |
|               | T2, T3          | N2a             | M0                |
|               | T1, T2          | N2b             | M0                |
| Stadium III C | T4a             | N2a             | M0                |
|               | T3, T4b         | N2b             | M0                |
|               | T4b             | N1, N2          | M0                |
| Stadium IV A  | Jedes T         | Jedes N         | M1a               |
| Stadium IV B  | Jedes T         | Jedes N         | M1b               |

## 6.2 Verwendete Materialien und Geräteliste

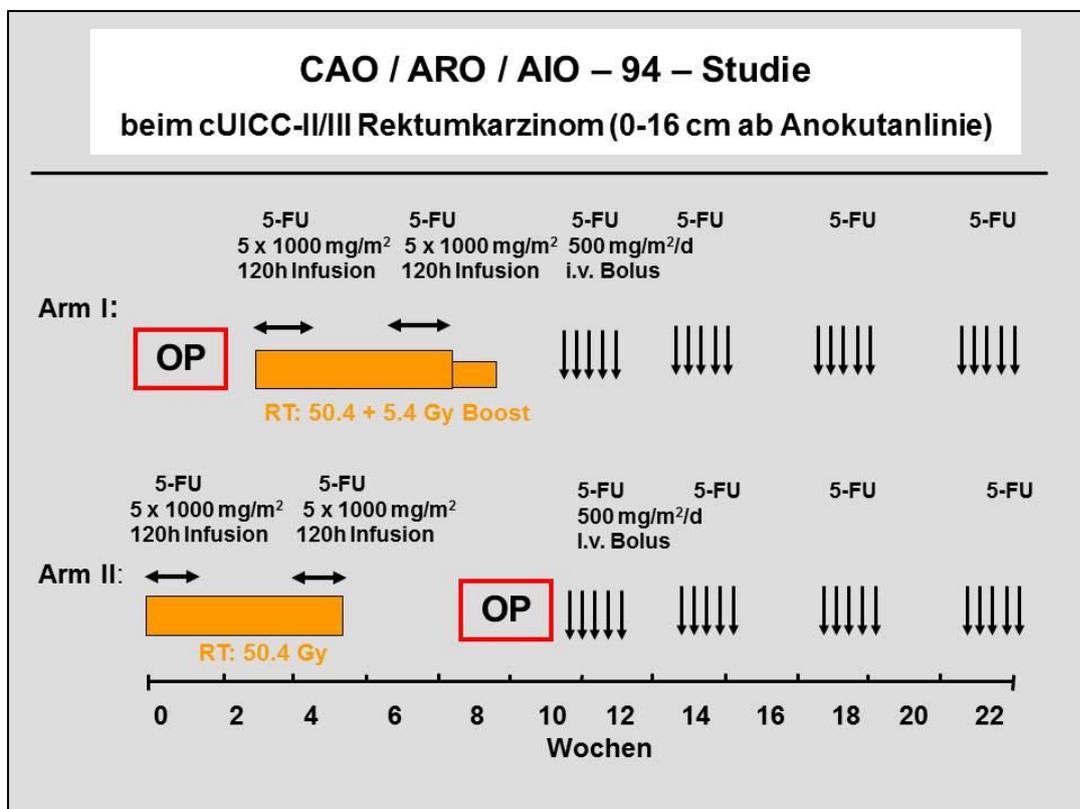
| Verwendete Materialien   | Hersteller, Firma, etc.   |
|--|---|
| Adhäsive Objektträger Starfrost  | Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland       |
| Ethanol 99%  | Chemie Vertrieb, Hannover, Deutschland                                |
| Deckgläser   | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland                        |
| Färbeautomat BenchMark XT  | Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA                          |
| Mikroskop Axio Imager II   | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland                             |
| Primärantikörper IHC:<br>Pathway® anti HER-2/neu (4B5)   | Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland                     |
| Primärantikörper Dual-ISH:<br>INFORM HER-2 Dual ISH DNA Probe Cocktail   | Ventana, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland                     |
| Schlittenmikrotom Microm HM 430  | MICROM International, Walldorf, Deutschland                           |
| Substanzen für den Färbeautomaten<br>BenchMark XT:<br>- EZ Prep<br>- LCS<br>- Reaktion- <i>Buffer</i><br>- CC1 (Cell Conditioner)<br>- <i>Antibody-Diluent</i><br>- Hämatoxilin II<br>- <i>Bluing</i> -Reagent | Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA                          |
| Wärmeschrank   | Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland                                  |
| ultraView Universal DAB Detection KIT enthält:<br>- Inhibitor<br>- Multimer Ig<br>- DAB<br>- Wasserstoffperoxid<br>- <i>Copper</i>   | Ventana Medical System, Mannheim, Deutschland                         |
| ultraView Red ISH DIG Detection KIT enthält:<br>- anti-DIG-Mausantikörper<br>- Multimer Ig<br>- ph-Verstärker<br>- Naphthol<br>- <i>Fast Red</i>   | Ventana Medical System, Mannheim, Deutschland                         |
| ultraView SISH DNP Detection KIT enthält:<br>- anti-DNP-Kaninchenantikörper<br>- HRP<br>- Chromogen A, B, C  | Ventana Medical System, Mannheim, Deutschland                         |
| Vitro Clud-Eindeckmittel   | R. Langenbrinck - Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland |
| Xylol  | Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande                        |

### 6.3 Studienprotokolle

#### GAST-05-Studie:

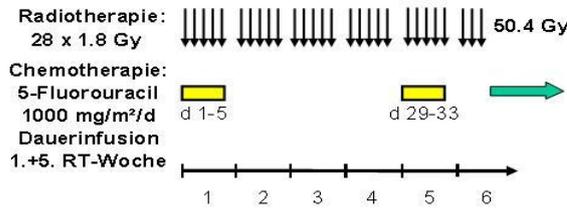


#### CAO/ARO/AIO-94-Studie:

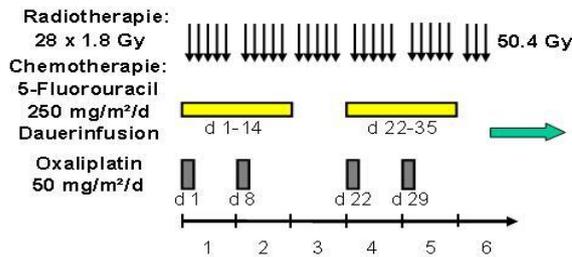


CAO/ARO/AIO-04-Studie:

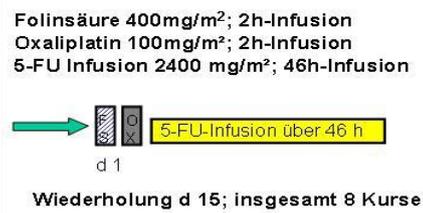
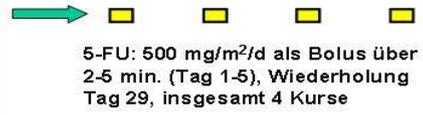
**KONTROLL-ARM:**



**EXPERIMENTELLER ARM:**



OPERATION



## 7 Literaturverzeichnis

Akhdar A, Bronsard M, Lemieux R, Geha S (2011): Détermination de l'amplification de l'oncogène HER-2 dans le cancer du sein invasif par hybridation chromogénique in situ double couleur (dc-CISH): Étude comparative avec l'hybridation fluorescente in situ (FISH). *Ann Pathol* 31, 472–479

Alexe G, Dalgin GS, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, DeLisi C, Harris L, Barnard N, Martel M, Levine AJ et al. (2007): High Expression of Lymphocyte-Associated Genes in Node-Negative HER2+ Breast Cancers Correlates with Lower Recurrence Rates. *Cancer Res* 67, 10669–10676

Alimandi M, Romano A, Curia M, Muraro R, Fedi P, Aaronson S, Di Fiore P, Kraus M (1995): Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813–1821

Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM (2000): c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 18, 2201–2209

Arasteh K, Baenkler HW, Bieber C: *Innere Medizin*, 2. Auflage, Thieme (Duale Reihe) Stuttgart 2009, 555

Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjudahl R (1996): Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 83, 375–379

Banck MS, Grothey A (2009): Biomarkers of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 15, 7492-7501

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T (2010): Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376, 687–697

Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S (2008): Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis. *Am J Clin Pathol* 129, 563–570

Becker H, Liersch T: *Viszeralchirurgie*, 2. Auflage, Urban & Fischer München 2006, 601-631

Beji A, Horst D, Engel J, Kirchner T, Ullrich A (2012): Toward the Prognostic Significance and Therapeutic Potential of HER3 Receptor Tyrosine Kinase in Human Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 18, 956–968

Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P (1990): Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50, 4087–4091

Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Cora D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C (2011): A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts ("Xenopatients") Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 1, 508–523

Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN: *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*, 3. Auflage, Dako North America Inc. Carpinteria, CA, USA 2006, 34-42

Bujko K, Glynne-Jones R, Bujko M (2010): Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials. *Ann Oncol* 21, 1743–1750

Cirisano FD, Karlan BY (1996): The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers. *J Soc Gynecol Investig* 3, 99–105

Conradi LC, Bleckmann A, Schirmer M, Sprenger T, Jo P, Homayounfar K, Wolff HA, Rothe H, Middel P, Becker H et al. (2011): Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann Surg Oncol* 18, 2442-2452

Conradi LC, Styczen H, Sprenger T, Wolff HA, Rödel C, Nietert M, Homayounfar K, Gaedcke J, Tauliclar R, Becker H et al. (2012): Frequency of HER-2 positivity in Rectal Cancer and Prognosis. *Am J Surg Pathol*, in press

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U et al. (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132–1139

Cuadros M, Talavera P, Lopez FJ, Garcia-Perez I, Blanco A, Concha A (2010): Real-time RT-PCR analysis for evaluating the Her2/neu status in breast cancer. *Pathobiology* 77, 38–45

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C et al. (2004): Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337–345

Davies RJ, Miller R, Coleman N (2005): Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer* 5, 199–209

Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W, Azambuja E de, Dafni U, Rueschoff J, Jordan B, Dolci S, Abramovitz M, Stoss O et al. (2009): Disease-Free Survival According to Degree of HER2 Amplification for Patients Treated With Adjuvant Chemotherapy With or Without 1 Year of Trastuzumab: The HERA Trial. *J Clin Oncol* 27, 2962–2969

Drebber U, Madeja M, Odenthal M, Wedemeyer I, Monig SP, Brabender J, Bollschweiler E, Holscher AH, Schneider PM, Dienes HP et al. (2011): beta-catenin and Her2/neu expression in rectal cancer: association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis. *Int J Colorectal Dis* 26, 1127–1134

Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A (1997): Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 12, 19–23

Eltze E, Wulfing C, Von Stuensee D, Piechota H, Buerger H, Hertle L (2005): Cox-2 and Her2/neu co-expression in invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 26, 1525–1531

Fang JY, Richardson BC (2005): The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6, 322–327

Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer: An International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6, 325–344

Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, Vignal J, Grandjean JP, Partensky C, Souquet JC, Adeleine P, Gerard JP (1999): Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial. *J Clin Oncol* 17, 2396

Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y (2007): Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 59, 795–805

Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H (2010a): Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes, Chromosom Cancer* 49, 1024–1034

Gaedcke J, Grade M, Jung K, Schirmer M, Jo P, Obermeyer C, Wolff H, Herrmann M, Beissbarth T, Becker H (2010b): KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 94, 76–81

Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rödel C, Ghadimi BM (2011): Rektumkarzinom: Aktueller Stand der multimodalen Therapie – wann und wie? *Zentralbl Chir* 136, 334–342

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P et al. (2006): Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964

Garcia I, Vizoso F, Martin A, Sanz L, Abdel-Lah O, Raigoso P, Garcia-Muniz JL (2003): Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 10, 234–241

Gavioli M, Bagni A, Piccagli I, Fundaro S, Natalini G (2000): Usefulness of endorectal ultrasound after preoperative radiotherapy in rectal cancer: comparison between sonographic and histopathologic changes. *Dis Colon Rectum* 43, 1075–1083

Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Füzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T (2005): Effectiveness of Gene Expression Profiling for Response Prediction of Rectal Adenocarcinomas to Preoperative Chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23, 1826–1838

Gravalos C, Jimeno A (2008): HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 19, 1523–1529

Graziano C (1998): HER-2 breast assay, linked to Herceptin, wins FDA's okay. *CAP Today* 12, 6-14

Grogan TM, McElhinny AS, Loftin I, Warren S, Sugarmann M, Miller R, Olivas-Brochu E, Roche P, Wolk E, Padilla M, Jones T: Interpretation Guide INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay, 1. Auflage, Roche Diagnostics GmbH Mannheim 2010, 2-26

Hermanek P (1992): Multivisceral resection of colorectal cancer--experiences of the Colorectal Cancer Study Group. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1, 195–100

Hermanek P, Hohenberger W, Klimpfinger M, Kockerling F, Papadopoulos T (2003): The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *Int J Colorectal Dis* 18, 335–341

Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Ruschoff J, Henkel T (2008): Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 52, 797–805

Hong TS, Clark JW, Haigis KM (2012): Cancers of the colon and rectum: identical or fraternal twins?. *Cancer Discov* 2, 171-121

Hubalek M, Brunner C, Matthä K, Marth C (2010): Resistance to HER2-targeted therapy: mechanism of trastuzumab resistance and possible strategies to overcome unresponsiveness to treatment. *Wien Med Wochenschr* 160, 506-512

Hudis CA (2007): Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357, 39–51

Hung MC, Schechter AL, Chevray PY, Stern DF, Weinberg RA (1986): Molecular cloning of the neu gene: absence of gross structural alteration in oncogenic alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 261–264

Hynes NE, Stern DF (1994): The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198, 165–184

Jemal A, Siegel R, Ward E, Brawley O (2011): Cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 61, 212–236

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au H, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ et al. (2007): Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357, 2040–2048

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S et al. (2008): K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359, 1757–1765

Kluftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL (1992): Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1, 97–105

Koka V, Potti A, Koch M, Fraiman G, Mehdi S, Levitt R (2002): Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 22, 1593–1597

Komoto M, Nakata B, Amano R, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, Wakasa K, Hirakawa K (2009): HER2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer. *Cancer Sci* 100, 1243–1247

Krook J, Moertel C, Gunderson L, Wieand H, Collins R, Beart R, Kubista T, Poon M, Meyers W, Mailliard J (1991): Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 324, 709–715

- Kruszewski WJ, Rzepko R, Ciesielski M, Szefel J, Zielinski J, Szajewski M, Jasinski W, Kawecki K, Wojtacki J (2010): Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. *Dis Markers* 29, 207–212
- Kulka J, Tokes A, Kaposi-Novak P, Udvarhelyi N, Keller A, Schaff Z (2006): Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - a comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res* 12, 197–204
- Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL (2009): Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74, 673–688
- Kuroda N, Kontani K, Kajikawa T, Taminato T (2010): Study of the measurement of serum extracellular domain of HER-2/neu protein with CLIA method. *Rinsho Byori* 58, 541–552
- Laurent-Puig P, Manceau G, Zucman-Rossi J, Blons H (2012): Dual blockade of epidermal growth factor receptor-induced pathways: a new avenue to treat metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 30, 1550–1552
- Lei S, Appert HE, Nakata B, Domenico DR, Kim K, Howard JM (1995): Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival. *Int J Pancreatol* 17, 15-21
- Liersch T, Langer C, Ghadimi B, Becker H (2005): Aktuelle Behandlungsstrategien beim Rektumkarzinom. *Chirurg* 76, 309–334
- Liersch T, Gaedcke J, Grade M, Sprenger T, Conradi L, Becker H, Ghadimi B (2010): Molekulare Marker zur Responseprädiktion beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom. *Onkologie* 16, 779–788
- Lievre A, Bachet J, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C et al. (2008): KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26, 374–379
- Liming S, Yuan Z, Qinghua D, Lei W, Qifeng J, Haojie L (2011): Human epidermal growth factor receptor-2 and topoisomerase II alpha expressions in rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 58, 359-363

Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Anton A, Lluch A (2005): Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23, 4265–4274

Marx AH, Burandt EC, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Atanackovic D, Bokemeyer C, Fiedler W et al. (2010): Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol* 41, 1577–1585

McCann A, Dervan P, O'Regan M, Codd M, Gullick W, Tobin B, Carney D (1991): Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 51, 3296–3303

M.E.R.C.U.R.Y.: M.E.R.C.U.R.Y. Project (Magnetic Resonance Imaging and Rectal Cancer European Equivalence Study) Study Protocol (Study Coordinator I. Daniels, FRCS, Pelican Centre, North Hampshire Hospital, Basingstoke, Hampshire, UK, 2002

Molina R, Escudero JM, Muñoz M, Augé JM, Filella X (2012): Circulating levels of HER-2/neu oncoprotein in breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 50, 5–21

Muto T, Bussey H, Morson B (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251–2270

Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H (1999): The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 85, 1894–1902

Olayioye M, Neve R, Lane H, Hynes NE (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19, 3159–3167

Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kinilowsky A, Milsson M, Damotte D et al. (2005): Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654-2666

Park D, Yun J, Park J, Oh S, Kim H, Cho Y, Sohn C, Jeon W, Kim B, Yoo C (2006): HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 51, 1371–1379

Park D, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Han WK, Kim H et al. (2007): HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 22, 491–497

Pedrini J, Francalacci S, Casales S, Cambruzi E, Grudzinski M, Zettler C (2011): The effect of neoadjuvant chemotherapy on hormone receptor status, HER2/neu and prolactin in breast cancer. *Tumori* 97, 704–710

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C et al. (2005): Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1659–1672

Piper GL, Patel NA, Patel JA, Malay MB, Julian TB (2004): Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer results in alterations in preoperative tumor marker status. *Am Surg* 70, 1103–1106

Porter G (1999): Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer treatment. *Int J Surg Investig* 1, 257–258

Pritchard K, Shepherd L, O'Malley F, Andrulis I, Tu D, Bramwell V, Levine M (2006): HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 354, 2103–2111

Pupa SM, Bufalino R, Invernizzi AM, Andreola S, Rilke F, Lombardi L, Colnaghi MI, Menard S (1996): Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2-overexpressing breast carcinomas. *J Clin Oncol* 14, 85-94

RDC (R Development Core Team) (2011): R: Language and Environment for Statistical Computing. URL: <http://www.r-project.org/>

Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst E, Knyazev P, Wild P, Hutterer M, Meyer S, Dummer R, Moch H, Ullrich A (2008): HER3 Is a Determinant for Poor Prognosis in Melanoma. *Clin Cancer Res* 14, 5188–5197

Resnick MB (2004): Epidermal Growth Factor Receptor, c-MET, -Catenin, and p53 Expression as Prognostic Indicators in Stage II Colon Cancer: A Tissue Microarray Study. *Clin Cancer Res* 10, 3069–3075

Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM (2000): HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 13, 866–873

Robert Koch Institut (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008 Krebs in Deutschland 8. Ausgabe, Robert Koch Institut, Berlin 2012, 36-39.

Rödel C, Liersch T, Becker H, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Graeven U, Arnold D, Lang-Welzenbach M, Raab H (2012): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 679–687

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, JR, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA et al. (2005): Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353, 1673–1684

Rosa F, Silveira S, Silveira C, Bergamo N, Neto F, Domingues M, Soares F, Caldeira J, Rogatto S (2009): Quantitative real-time RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. *BMC Cancer* 9, 90

Ross J, Fletcher J (1998): The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3, 237–252

Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard M, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W (2010): HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 457, 299–307

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess C (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351, 1731–1740

Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab H, Villanueva M, Witzigmann H (2012): Preoperative Versus Postoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 Randomized Phase III Trial After a Median Follow-Up of 11 Years. *J Clin Oncol* 30, 1926–1933

Saxby A, Nielsen A, Scarlett CJ, Clarkson A, Morey A, Gill A, Smith RC (2005): Assessment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinomas: correlation of immunohistochemistry, quantitative real-time RT-PCR, and FISH with aneuploidy and survival. *Am J Surg Pathol* 29, 1125-1134

Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Fölsch U, Frühmorgen P, Graeven U, Heinemann V (2010): S3 Guidelines for Colorectal Carcinoma. *Z Gastroenterol* 48, 65–136

Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, Manning J, Zhao XY, Fang K, Roth JA (1989): Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 49, 4968–4971

Schuell B, Gruenberger T, Scheithauer W, Zielinski C, Wrba F (2006): HER 2/neu protein expression in colorectal cancer. *BMC Cancer* 6, 123

Sergina N, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat K, Moasser M (2007): Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445, 437–441

Shiroiwa T, Fukuda T, Shimosuma K (2011): Cost-effectiveness analysis of trastuzumab to treat HER2-positive advanced gastric cancer based on the randomised ToGA trial. *Br J Cancer* 105, 1273–1278

Sithanandam G, Fornwald L, Fields J, Anderson L (2005): Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncogene* 24, 1847–1859

Skalova H, Dundr P, Povysil C, Velenska Z, Petruzela L, Tvrdik D (2011): Study of the effect of neoadjuvant chemotherapy on the status of Her2/neu. *Folia Biol* 57, 191–199

Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182

Slamon D, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712

Sobin LH (2003): TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol* 21, 19-22.

Soreide O: International standardization and documentation of the treatment of rectal cancer. Springer, Berlin Heidelberg New York 1997, 405-445

Spano JP, Fagard R, Soria J, Rixe O, Khayat D, Milano G (2005): Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol* 16, 189–194

Spears M, Pederson HC, Lyttle N, Gray C, Quintayo MA, Brogan L, Thomas JS, Kerr GR, Jack WJ, Kunkler IH et al. (2012): Expression of activated type I receptor tyrosine kinases in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134, 701-708

Tanner B, Hasenclever D, Stern K, Schormann W, Bezler M, Hermes M, Brulport M, Bauer A, Schiffer I, Gebhard S (2006): ErbB-3 Predicts Survival in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 24, 4317–4323

Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E et al. (2005): Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 16, 273–278

Tveit K, Guldvog I, Hagen S, Trondsen E, Harbitz T, Nygaard K, Nilsen J, Wist E, Hannisdal E (1997): Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. *Br J Surg* 84, 1130–1135

Van Cutsem E, Kohne C, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G et al. (2009): Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360, 1408–1417

Van der Horst E, Weber I, Ullrich A (2005): Tyrosine phosphorylation of PYK2 mediates heregulin-induced glioma invasion: novel heregulin/HER3-stimulated signaling pathway in glioma. *Int J Cancer* 113, 689–698

Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, Hultborn R, Malmstrom P, Bengtsson N, Soderberg M, Saksela E, Blomqvist C (2006): TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol* 45, 590–596

Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A, Bos J (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525–532

Weickhardt AJ, Price TJ, Chong G, GebSKI V, Pavlakis N, Johns TG, Azad A, Skrinos E, Fluck K, Dobrovic A et al. (2012): Dual Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor Using the Combination of Cetuximab and Erlotinib: Preclinical Evaluation and Results of the Phase II DUX Study in Chemotherapy-Refractory, Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 30, 1505–1512

Weiner D, Nordberg J, Robinson R, Nowell P, Gazdar A, Greene M, Williams W, Cohen J, Kern J (1990): Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50, 421–425

Wibe A, Møller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig J, Heald R, Langmark F, Myrvold H, Søreide O (2002): A National Strategic Change in Treatment Policy for Rectal Cancer—Implementation of Total Mesorectal Excision as Routine Treatment in Norway. *Dis Colon Rectum* 45, 857–866

Wittekind CM, Meyer HJ: TNM - Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage Wiley-Blackwell, Weinheim 2010, 94-99

Wolmark N, Wieand H, Hyams D, Colangelo L, Dimitrov N, Romond E, Wexler M, Prager D, Cruz A, Gordon P (2000): Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst* 92, 388–396

Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Kunz J, Beger HG, Korc M (1993): Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 24, 1127–1134

Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A (2006): Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 15, 65–71

Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, Ercan D, Rogers A, Roncalli M, Takeda M (2011): Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 3, 86-99

Yoon HH, Shi Q, Sukov WR, Wiktor AE, Khan M, Sattler CA, Grothey A, Wu T, Diasio RB, Jenkins RB et al. (2012): Association of HER2/ErbB2 Expression and Gene Amplification with Pathologic Features and Prognosis in Esophageal Adenocarcinomas. *Clin Canc Res* 18, 546-554

Zhang X, Yang Y, Xu D, Qu J, Guo M, Gong Y, Huang J (2009): Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg* 33, 2112–2118

---

## Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Lena-Christin Conradi, die mich seit Beginn meiner Promotion unterstützt hat. Durch Ihre Idee und die Organisation zweier Doktorandenfahrten habe nicht nur ich erhebliche Fortschritte in meiner Promotionsarbeit erzielt. Mit ihrem Ehrgeiz und ihrer Begeisterung für die Allgemein- und Viszeralchirurgie hat auch sie mich für die Fachdisziplin und auch für weitere Projekte innerhalb der Arbeitsgruppe gewinnen können. Die Präsentation meiner Ergebnisse auf dem amerikanischen Krebskongress in Chicago zusammen mit Dr. Conradi war ein Highlight meines Medizinstudiums.

Mein Dank geht ebenfalls an PD Dr. med. Liersch, der meine Promotion durch seine Ideen und konstruktive Kritiken bis zur Fertigstellung vorangebracht hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Gisbert Vogt für seine finanzielle Unterstützung der Doktorandenfahrten und Birgit Jünemann für ihre außerordentliche Hilfe im Labor und für ihr herausragendes Talent, perfekte Paraffinschnitte anzufertigen.

Nicht vergessen möchte ich Matthias Specking, der mich ermutigt hat, mich in der Arbeitsgruppe der Allgemein- und Viszeralchirurgie für eine Promotion zu bewerben und der durch seine Mithilfe an der Fahrt nach Prag und seine Unterstützung während der Niederschrift das Vorantreiben meiner Promotion begleitet hat.

Schlussendlich möchte ich mich bei Mathias Pantke bedanken. Durch seine unermüdliche Bereitschaft und Geduld zum Korrekturlesen sowie durch seine Anregungen und Ideen hat er meine Promotion entscheidend geprägt.