

Aus dem
CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Geburtsmedizin
Direktor: Professor Dr. J.W. Dudenhausen

Habilitationsschrift

Einflussgrößen der Metastasierung und ihre klinische Bedeutung am Beispiel der Intermediärfilamente und der Onkogenfamilie HER1-HER4.

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Gynäkologie und Geburtshilfe

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Ilka Fuchs
geboren am 13. 09.1971 in Marburg

eingereicht: September 2007

Dekan: Professor Dr. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. Zielinski, Wien
2. Gutachter: Prof. Dr. Walther Kohn, Bonn

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	S. 5
2	Einleitung	S. 7
2. 1	Die Intermediärfilamente der Brustdrüsenzellen und ihre Rolle im Rahmen der malignen Transformation	S. 8
2. 2	Das Onkogen HER2	S. 9
2. 3	HER2 im Kontext der Dimerisationspartner HER1, HER3 und HER4	S. 10
2. 4	HER1-HER4 beim Zervixkarzinom: Expression und prognostische Bedeutung	S. 11
2. 5	Neue Therapiestrategien: Die Immuntherapie mit dem HER2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin).	S. 12
2. 6	Grenzen und Möglichkeiten der spezifischen HER2 blockierenden Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin)	S. 14
2. 6. 1	Die fehlende Wirkung von Trastuzumab bei zerebraler Metastasierung	S. 14
2. 6. 2	Die Kardiotoxizität von Trastuzumab bei anthracyclin behandelten oder kardial vorgeschädigten Patientinnen	S. 15
2. 6. 3	Neue Einsatzmöglichkeiten: Trastuzumab beim intensiv vorbehandelten HER2 positiven Mammakarzinom	S. 16

3	Zielsetzung	S. 17
4	Eigene Arbeiten	
4. 1	Schaller, G., Fuchs, I. et. al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. Clin. Cancer Res. 1996; 2: 1879-1885.	S. 18
4. 2	Fuchs, I. et al. The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. Anticancer Res. 2002; 22: 3415-3420.	S. 19
4. 3	Fuchs, I. et al. Epidermal growth factor receptor changes during breast cancer metastasis. Anticancer Res. 2006; 26: 4397-4402.	S. 20
4. 4	Fuchs, I. et al. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma, Anticancer Research 2007; 27: 959-963.	S. 21
4. 5	Fuchs I. et al. HER2 in Brain Metastases: Issues of Concordance, Survival, and Treatment. J Clin. Oncol. 2002, 20: 4130-4133.	S. 22
4. 6	Fuchs I. et al. Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). Breast Cancer Res. Treat. 2003, 82: 23-28.	S. 23
4. 7	Schaller, G. / Fuchs, I. (Equal contribution) et al. Phase II Study with Capecitabine and Trastuzumab in HER2-overexpressing Metastatic Breast Cancer pretreated with Anthracyclines and/or Taxanes.	

	J. Clin. Oncol. 2007, 25: 3246-3250.	S. 24
5	Diskussion	S. 25
6	Danksagung	S. 34
7	Literaturverzeichnis	S. 35
8	Eidesstattliche Erklärung	S. 39

1 Zusammenfassung

In dieser Habilitationsschrift wurden Einflussgrößen der Fernmetastasierung anhand des Expressionsverhaltens der Intermediärfilamente sowie der Onkogenfamilie der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (HER: HER1, HER2, HER3, HER4) in Mamma- und Zervixkarzinomen untersucht.

Es wurde gezeigt, dass im Rahmen der malignen Transformation beim Mammakarzinom ein grundlegender Wechsel des Intermediärfilamente vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp stattfindet. Durch den Verlust der epithelialen Keratine mit Neuexpression des mesenchymalen Vimentins wird aufgrund der veränderten mechanischen Eigenschaften der Tumorzelle eine Fernmetastasierung begünstigt.

Diese strukturellen Zellskelettveränderungen, insb. die aberrante Expression des mesenchymalen Vimentins werden durch das Onkoprotein HER2 beeinflusst.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass sich beim Mammakarzinom das Expressionsverhalten der vier epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1-HER4 im Rahmen der Fernmetastasierung verändert. Im Vergleich zwischen Primärtumor und Fernmetastase kann sowohl ein Verlust der HER Onkoproteine als auch eine Neuexpression beobachtet werden. Eine mögliche Änderung des Expressionsprofils in der Fernmetastase muss daher bei der prädiktiven Bestimmung der HER-Rezeptoren, insbesondere von HER2 berücksichtigt werden.

Auch beim Zervixkarzinom konnten eine Expression aller vier HER-Rezeptoren nachgewiesen werden. Unter Verwendung standardisierter Nachweisverfahren wurde das Onkogen HER2 beim Zervixkarzinom in ähnlicher Häufigkeit exprimiert wie beim Mammakarzinom.

Es wurde gezeigt, dass für die prognostische Bedeutung eines jeweiligen HER Rezeptors nicht die Expression des einzelnen Rezeptors allein, sondern die Koexpression mit den anderen HER Rezeptoren, die als Dimerisationspartner interagieren, entscheidend ist. Dabei unterscheidet sich die prognostische Bedeutung der vier Rezeptoren. Während HER1, HER2 und HER3 eine schlechte Prognose vermitteln, ist eine Überexpression von HER4 mit einer günstigen Prognose verbunden.

Wird darüber hinaus HER1 mit HER4 beim Zervixkarzinom koexprimiert, vermittelt auch HER1 nicht eine ungünstige, sondern eine günstige Prognose. Diese Beobachtungen haben entscheidende klinische Konsequenzen, insbesondere für den Einsatz HER gerichteter Antikörpertherapien.

Auf die derzeit etablierteste derartiger Antikörpertherapien, der Immuntherapie mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin) fokussiert sich der folgende Teil der Arbeit. Trastuzumab zeigt entscheidende Grenzen seiner Wirksamkeit bei Patientinnen mit Hirnmetastasierung. Es konnte bewiesen werden, dass beim Mammakarzinom das Onkoprotein HER2 als Zielantigen in den Hirnmetastasen nachweisbar ist. Da trotz HER2 Überexpression in der Hirnmetastase ein Krankheitsprogress unter Trastuzumab Therapie nachweisbar ist, scheint eine verminderte Penetration des Antikörpers durch die Blut-Hirnschranke als Ursache der eingeschränkten Wirksamkeit von Trastuzumab in dieser Metastasierungssituation wahrscheinlich.

Eine der wenigen ernstesten Nebenwirkungen einer Trastuzumab Therapie ist die ungeklärte Kardiotoxizität bei Frauen mit Herzvorerkrankung oder Anthracyclinvortherapie. Eine gängige Hypothese ist eine Hochregulierung protektiver HER2 Rezeptoren im Rahmen der myokardialen Stressregulation. Es wurde gezeigt, dass am geschädigten oder anthracyclin vorbelasteten Myokard keine signifikante Expression von HER2 oder HER4 nachweisbar ist, so dass eine HER2-Blockade im Myokard als Ursache der Kardiotoxizität des HER2 Antikörpers Trastuzumab unwahrscheinlich erscheint.

Schließlich wurde der Einsatz von HER2 in Kombination mit Capecitabine als neue Therapieform bei Problempatientinnen mit progredientem metastasiertem HER2 überexprimierendem Mammakarzinom nach intensiver Vorbehandlung untersucht. Es konnte in einer Phase II Studie gezeigt werden, dass diese Kombinationstherapie aus Capecitabine und Trastuzumab eine effektive Therapieoption unter Erhalt der Lebensqualität dieser schwierig zu behandelnden Patientinnen darstellt.

2 Einleitung

Die Metastasierung ist der prognostisch entscheidende Moment im Krankheitsverlauf eines epithelialen Malignoms. Mit Eintritt einer Fernmetastasierung entsteht aus einem lokal begrenzten Karzinom eine systemische Tumorerkrankung. Dies ist gleichbedeutend mit dem fatalen Ausgang der Erkrankung.

Der erste Schritt der Metastasierung ist die Ablösung der Tumorzelle aus dem Zellverband, der Eintritt in Lymph- und Blutgefäße und schließlich die Ansiedelung in einem vom Primärtumor entfernten Organ. Für diesen komplexen Ablauf ist eine Adaptation der mechanischen Zellausstattung notwendig.

Der nachfolgende Schritt der Metastasierung ist das unregulierte Wachstum der Tumorzelle. An diesem sind Onkogene maßgeblich beteiligt.

Onkogene entstehen aus körpereigenen Genen, sogenannten Protoonkogenen durch Punktmutation, Translokation o.ä. Unter physiologischen Umständen nehmen diese Gene Schlüsselfunktionen meist im Bereich der Zellproliferation und Apoptose ein. Im Rahmen der malignen Transformation sind sie der Regulation entzogen und vermitteln in Folge ein unkontrolliertes Wachstum.

Ziel der Studien, die diese Habilitationsschrift umfasst, ist es, verschiedene Einflussgrößen dieser Metastasierungsschritte sowie ihre therapeutische Beeinflussbarkeit zu untersuchen:

Im ersten Teil der Arbeit wird der Strukturwandel der Tumorzelle im Bereich des Zytoskeletts als Grundvoraussetzung einer Metastasierung erforscht.

Im zweiten Teil wird die Bedeutung der Onkogenfamilie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1-HER4 für die Metastasierung des Mammakarzinoms und Zervixkarzinoms untersucht. Daneben wird auf die Möglichkeiten, Grenzen und Probleme einer HER2 spezifischen Antikörpertherapie eingegangen. Der klinischen Wertigkeit und Nutzbarkeit der Ergebnisse wird bei jeder der Studien eine besondere Bedeutung zugemessen.

2. 1 Die Intermediärfilamente der Brustdrüsenzellen und ihre Rolle im Rahmen der malignen Transformation

Die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Malignitätsmerkmale einer Tumorzelle. Voraussetzung hierfür ist eine Zunahme der Zellmotilität, Plastizität und eine Aufhebung der geweblichen Integrität. In einem gesunden Zellverband werden die spezifischen Eigenschaften eines Gewebes wie Form, Aufbau und Zusammenhalt der Zellen insbesondere durch die Intermediärfilamente des Zytoskeletts bestimmt¹. In Epithelien ist ein fester Zellverband notwendig, die Zellstabilität ist der jeweiligen mechanischen Beanspruchung angepasst. Dagegen ist in mesenchymalen Zellen wie den Blutzellen ein strenger Zellverband nicht zwingend erforderlich, in Blutzellen spielt die Plastizität eine übergeordnete Rolle.

Die Intermediärfilamente der Epithelien werden durch eine Gruppe aus 20 Keratinen (K) gebildet². Dabei ist eine paarweise Expression typisch³. Die unterschiedlichen geweblichen Anforderungen der verschiedenen Epithelien spiegeln sich in der jeweiligen Keratinzusammensetzung wieder. Das spezifische Keratinmuster einer Epithelzelle kennzeichnet dabei nicht nur den Epitheltyp, sondern auch den Funktions- und Differenzierungszustand der einzelnen Epithelzelle⁴. Unter physiologischen Bedingungen bildet das Keratinpaar 8 und 18 die charakteristischen Intermediärfilamente der luminalen Zellen des Brustdrüsenepithels². Darüber hinaus kann in den meisten Luminalzellen Keratin 19 nachgewiesen werden². Das Intermediärfilament der mesenchymalen Zellen wie der Blutzellen wird ausschließlich durch Vimentin gebildet⁵. In der gesunden luminalen Zelle des Brustdrüsenepithels wird Vimentin nicht exprimiert.

Klinisch ist die Analyse der Intermediärfilamente ein wichtiger Bestandteil der pathologischen Diagnostik. Der Erhalt der spezifischen Keratinausstattung im Karzinom ermöglicht die histogenetische Zuordnung von Tumorgewebe⁶. Daneben werden die Keratine als Epithelzellmarker etwa bei der Mikrometastasensuche im Knochenmark⁷, im Sentinel Lymphknoten⁸ oder bei flowzytometrischen Analysen⁹ eingesetzt.

Bisher ist ungeklärt,

- ob im Rahmen der malignen Transformation mit veränderten Anforderungen der Tumorzelle an Plastizität und Gewebeverhalten ein Wechsel der Intermediärfilamente stattfindet,
- welche prognostische Bedeutung ein möglicher Wechsel beinhaltet und
- wodurch ein Wechsel der Intermediärfilamente beeinflusst werden könnte.

Eine Einflussgröße der physiologischen Keratinexpression stellen epidermale Wachstumsfaktorliganden dar¹⁰. Daher liegt eine Beeinflussung der Expression in der transformierten Tumorzelle durch das wachstumsregulierenden Onkogen HER2 (**H**umaner **E**pidermaler Wachstumsfaktor-**R**ezeptor 2) nahe.

2. 2 Das Onkogen HER2

Das Onkogen HER2/neu, auch c-erbB2 oder c-neu genannt wurde bei Transfektionsexperimenten an chemisch induzierten Neuroglioblastomen der Ratte entdeckt¹¹. Das humane Gen liegt auf Chromosom 17 und kodiert einen transmembranen 185 kD Phosphoglykoprotein-Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. In seiner physiologischen Funktion ist dieses Gen im Rahmen der Embryogenese an der Wachstumsregulation verschiedener Organsysteme, einschließlich des Mammaepithels und des kardialen Trabekelsystems beteiligt¹². In adulten Epithelien kann HER2 häufig in sehr geringer Expressionsstärke nachgewiesen werden. Im Rahmen der malignen Transformation führt eine Genamplifikation und Proteinüberexpression zu einer Deregulation der Proliferationsmechanismen mit überschießendem Zellwachstum. Eine Überexpression von HER2 wurde für eine Vielzahl von Karzinomen wie dem Bronchial-, Ovarial-, Magen-, Colon-, Pancreas-, und Prostatakarzinomen beschrieben¹³. 20-30% der invasiven Mammakarzinome zeigen eine HER2-Überexpression. HER2-positive Mammakarzinome kennzeichnet ein aggressives Tumorverhalten, ein hohes Metastasierungspotential und eine schlechte Prognose^{14,15}.

2.3 Das Onkogen HER2 im Kontext der Dimerisationspartner HER1, HER3 und HER4.

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2 gehört derzeit beim Mammakarzinom zu einem der wichtigsten prädiktiven Tumormerkmale. Bekannt ist, dass HER2 seine intrazelluläre Wirkung nicht allein, sondern im Zusammenspiel mit drei weiteren epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1 (EGFR), HER3 und HER4 vermittelt. Um die Wirkungsweise von HER2 im Karzinom und seine Bedeutung im Metastasierungsprozess zu untersuchen, erscheint eine Untersuchung der gesamten Rezeptorfamilie unerlässlich.

Die vier Mitglieder der Familie der epidermalen Typ I-Wachstumsfaktorrezeptoren HER1 (EGFR), HER2, HER3 und HER4 sind integrale Membranproteine, die aus einer Polypeptidkette bestehen und als Tyrosinkinase wirken. Sie haben eine gemeinsame Struktur: eine extrazelluläre liganden-bindende N-terminale Proteindomäne, ein transmembranes lipophiles Segment und eine cytoplasmatische C-terminale Proteindomäne mit Tyrosinkinaseaktivität. HER2 und HER3 unterscheiden sich durch folgende Besonderheiten von der beschriebenen Struktur: HER3 fehlt als einzigem Rezeptor der katalytische Anteil, so dass er keine eigene Kinaseaktivität besitzt¹⁶. Dagegen konnte bisher für HER2 als einzigem Rezeptor kein eigener Ligand nachgewiesen werden (orphan receptor)¹⁷.

Die Signaltransduktion durch Dimerbildung:

Die HER-Rezeptoren liegen in der Plasmamembran als Monomere vor. Eine Rezeptoraktivierung erfordert jedoch die Bildung von Rezeptorpaaren (Dimere)^{18,19}. Sowohl Homodimere (e.g. HER1/HER1) als auch Heterodimere (e.g. HER1/HER2) rufen eine Signalantwort hervor, jedoch weisen Heterodimere eine höhere Stabilität als Monomere auf²⁰. HER2 bildet unter den vier HER-Rezeptoren den bevorzugten Dimerisationspartner. HER2-haltige Heterodimere führen zu einer starken Signalantwort aufgrund einer langsamen Ligandendissoziation und einer verzögerten Induktion des Komplexabbaus. Den aktivsten Komplex mit der stärksten Mitoserate stellt die

Partnerbildung des ligandenlosen HER2-Rezeptors und HER3, dem Rezeptor ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität dar. Entsprechend ist das HER2/HER3 Dimer die häufigste Heterodimer-Kombination in Karzinomzellen.

Signaltransduktion:

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des HER-Rezeptormonomers führt zur Rezeptordimerbildung. Die intrinsische Tyrosinkinase wird aktiviert und autophosphoryliert die cytoplasmatischen Tyrosinreste des Rezeptors, welche als Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle (second messenger) dienen. Jeder Tyrosinrest bindet spezifisch einen second messenger, der entweder eine SH2- (Src homology 2) oder eine PTB- (Phosphotyrosin-bindende) Domäne trägt und bestimmt so die Vielzahl der intrazellulären Transduktionskaskaden. Die Signalantwort mündet je nach Zell- und Dimer-Typ in Zellproliferation, Inhibition der Apoptose, Angiogenese und vielem mehr.

Beim Mammakarzinom ist eine HER2 Überexpression mit einem aggressiven Tumorverhalten, früher Metastasierung und schlechter Prognose verbunden. Darüber hinaus zeigen HER2 positive Mammakarzinome häufig eine Resistenz gegenüber antiöstrogenen Therapien und gegenüber bestimmten Zytostatika wie Taxol.

Der Wachstumsfaktorrezeptor HER1 entspricht EGFR. Eine HER1 Überexpression ist ebenso wie HER2 mit einem malignem Potential und schlechter Prognose verbunden^{21,22}. Die Studienlage zu HER3 und HER4 beim Mammakarzinom ist begrenzt. Die meisten Studien weisen auch für HER3 eine Korrelation mit einem aggressiven Tumorverhalten nach²³, bei HER4 sind die Ergebnisse widersprüchlich.

2.4 HER1-HER4 beim Zervixkarzinom: Expression und prognostische Bedeutung

Anders als beim Mammakarzinom sind die Daten zum Expressionsverhalten von HER2 im Zervixkarzinom kontrovers. Während in einigen Studien - meist mit Hilfe nicht-standardisierter Nachweismethoden- hohe Expressionsraten von HER2 nachgewiesen wurden, konnten andere Autoren HER2 nur in einem sehr geringen Prozentsatz der

Zervixkarzinome beobachten. Kenntnisse über das Expressionsverhalten der weiteren Rezeptoren HER1, HER3 und HER4 sind insgesamt begrenzt. Auch die prognostische Bedeutung der verschiedenen Rezeptoren ist nicht einheitlich geklärt. Obwohl die meisten Studien ähnlich wie bei Mammakarzinom eine HER2 Überexpression mit schlechter Prognose assoziieren, gibt es Studien, die aus ungeklärter Ursache bei HER2 positiven Karzinomen eine verbesserte Prognose nachweisen konnten. Das Zervixkarzinom ist weiterhin die führende Krebstodesursache der jungen Frau. Die Behandlung eines Zervixkarzinoms im fortgeschrittenen Stadium ist ausgesprochen schwierig. Eine systemische Therapie, meist als platinhaltige Radiochemotherapie durchgeführt, zeigt nur begrenzte Effektivität. Eine Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten durch eine tumor-spezifische Immuntherapie, etwa mit Hilfe eines HER2-gerichteten Antikörpern wäre in dieser Patientinnengruppe eine wünschenswerte Therapieerweiterung (siehe unten).

2. 5 Neue Therapiestrategien: Die Immuntherapie mit dem HER2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin)

Die Kenntnis des malignen Potentials der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren im Karzinom führte zu der Entwicklung monoklonaler Antikörper als spezifische Immuntherapeutika. Der bedeutendste Antikörper dieser Art ist der 1998 zugelassene humanisierte monoklonale HER2 Antikörper Trastuzumab (*Herceptin*[®], Genentech, South San Francisco, CA).

Eine Bindung von Trastuzumab an die HER2 überexprimierende Tumorzelle führt zu:

- einer Downregulation des Rezeptors mit Unterbrechung der Dimerisation²⁴
 - einer Induktion der Suppressorgene p27^{kip1} und p21^{cip1/WAF1} mit Proliferationshemmung durch Hemmung des Zellzyklus in der G1-Phase²⁵
 - einer Hemmung der Angiogenese durch Blockade proangiogenetischer Faktoren und Induktion von Anti-Angiogenesefaktoren²⁶
 - und schließlich zu einer Antikörper-vermittelten Zelltoxizität durch Stimulation natürlicher Killerzellen²⁷.

Durch eine HER2 Therapie konnten beim metastasierten Mammakarzinom sowohl als Monotherapie²⁸ als auch in Kombination mit einer Chemotherapie²⁹ herausragende Therapieerfolge mit hohen Ansprechraten und verbessertem Überleben nachgewiesen werden. Eine Voraussetzung für eine Therapie mit Trastuzumab ist der Nachweis einer starken Proteinüberexpression in standardisierten immunhistochemischen Nachweismethoden³⁰. Bei nur moderater HER2 Überexpression ist der zusätzliche Nachweis einer HER2 Genamplifikation durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) erforderlich³¹. Die prädiktive Bestimmung des HER2 Status wird derzeit fast ausschließlich am Primärtumor und nicht am metastatischen Tumorgewebe durchgeführt.

Der Erfolg von Trastuzumab als neues Therapiekonzept beim Mammakarzinom trieb die Entwicklung weiterer monoklonaler Antikörper für die klinische Therapie voran. Antikörper wie *Cetuximab* (Erbix[®], ImClone Systems, New York, NY), ein chimärer (human-muriner) monoklonaler HER1 Antikörper sind bereits zugelassen³². Auch der komplett humanisierte Antikörper *ABX-EGF* (Abgenix, Fremont, CA) ohne immunogene Komponente richtet sich mit hoher Affinität und Spezifität gegen EGFR³³. Die völlige Eradikation von Tumorzelllinien und die Suppression von Mammakarzinomzellen ist in vitro Experimenten mit diesem EGFR-Antikörper gelungen³⁴. Darüber hinaus schützte *ABX-EGF* mit Krebszellen geimpfte Mäuse vor soliden Tumoren.

Ein ähnlicher therapeutischer Angriffspunkt ist die Blockade der Tyrosinkinase-Phosphorylierung mit Inaktivierung der nachfolgenden rezeptorgesteuerten Signalwege durch sogenannte Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). In Europa und den USA zugelassene Substanzen, die spezifisch HER1-Kinasen hemmen sind *Gefitinib* (Iressa[®], AstraZeneca, Macclesfield, UK) und *Erlotinib* (Tarceva[®], OSI Pharmaceuticals, Tarrytown, NY).

Zunehmend befinden sich auch Antikörper mit einem breiteren Spektrum in der klinischen Prüfung unter der Vorstellung, durch die Blockade mehrerer HER Rezeptoren gleichzeitig (HER1+2: *PKI-166* und *GW-2016*) oder sogar alle vier Rezeptoren (pan-HER: *CI-1033*) die Antitumorwirkung zu erhöhen³⁵.

2. 6 Grenzen und Möglichkeiten der spezifischen HER2 blockierenden Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin)

Drei Problemstellungen einer HER2 Antikörpertherapie wird in dieser Arbeit nachgegangen:

- der fehlenden Wirksamkeit von Trastuzumab bei Hirnmetastasen
- der ungeklärten Kardiotoxizität von Trastuzumab
- der Möglichkeit einer neuen Kombinationstherapie von Trastuzumab mit Capecitabine beim intensiv vorbehandelten Mammakarzinom

2. 6. 1 Die fehlende Wirkung von Trastuzumab bei zerebraler Metastasierung

Das Mammakarzinom ist die zweithäufigste Ursache einer Hirnmetastasierung³⁶. Trotz aller therapeutischen Interventionen wie Tumorchirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie ist die Prognose nach Hirnmetastasierung ausgesprochen schlecht, das Überleben beträgt im Durchschnitt nur wenige Monate³⁷. Der HER2 Antikörper Trastuzumab zeigt eine hohen Effizienz bei extrazerebraler Metastasierung HER2 positiver Mammakarzinome. Die Wirksamkeit bei Hirnmetastasen ist jedoch umstritten³⁸. Es gibt sogar Hinweise, dass HER2 positive Karzinome unter Trastuzumab-Therapie bevorzugt Hirnmetastasen ausbilden³⁹.

Als Ursache einer verminderten Wirksamkeit wird eine veränderte Tumorausstattung mit Verlust von HER2 in der Hirnmetastase diskutiert. Eine andere Möglichkeit besteht in einer eingeschränkten Penetration des Antikörpers durch die Blut-Hirnschranke, obwohl gerade bei Karzinomerkrankungen die Blut-Hirnschranke meist entscheidend gestört oder aufgehoben ist.

2. 6. 2 Die Kardiotoxizität von Trastuzumab bei anthracyclin vorbehandelten oder kardial vorgeschädigten Patientinnen

Die Therapie mit dem HER2 Antikörper Trastuzumab hat aufgrund der tumorspezifischen Wirkungsweise eine ausgesprochen gute Verträglichkeit. Die typischen Nebenwirkungen wie Blutbildveränderungen, Schleimhauttoxizität oder Haarausfall, die den meisten Chemotherapeutika aufgrund ihrer unspezifischen Abtötung proliferierender Zellen eigen ist, fehlen fast vollständig. Eine der wenigen ernststen Nebenwirkungen unter Trastuzumab ist das Auftreten von Herzfunktionsstörungen unter der sehr wirksamen Kombinationstherapie mit Anthracyclinen sowie bei Patientinnen mit Herzvorerkrankungen. Die Ursachen dieser Kardiotoxizität von Trastuzumab sind unklar. Eine Bindung von Trastuzumab an HER2 Rezeptoren im Herzmuskel ist eine der gängigen Hypothesen.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass HER2 eine entscheidende Rolle bei der Kardiogenese und Kardioprotektion spielt: HER2 ist notwendig für eine regelrechte Entwicklung des kardialen Trabekelsystems⁴⁰. Wachstum und Überleben der Myozyten werden durch eine HER2/HER4 Signaltransduktion gefördert⁴¹. Im Tiermodell führt eine herz-spezifische HER2 Deletion zu einer Kardiomyopathie mit Kammerdilatation, Myokardverlust und Abnahme der Kontraktilität. Die Kardiomyocyten dieser Mutanten zeigen eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der Kardiotoxizität alkylierender Substanzen⁴². Darüber hinaus ist bei dem Übergang einer kompensierten Herzhypertrophie in ein Herzversagen ein Verlust der kardialen HER2 und HER4 Expression zu beobachten⁴³.

2. 6. 3 Neue Einsatzmöglichkeiten: Trastuzumab beim intensiv vorbehandelten metastasierten HER2 positiven Mammakarzinom

Eine Herausforderung in der Behandlung des HER2 überexprimierenden Mammakarzinoms stellt die therapeutische Intervention bei Frauen mit fortgeschrittenen Tumoren mit intensiver chemotherapeutischer Vorbehandlung dar. Ziel einer erneuten systemischen Therapie ist der Aufschub der Tumorprogression ohne eine Beeinträchtigung der Lebensqualität. Durch die exzellente Verträglichkeit bei gleichzeitig hoher Effektivität stellt Trastuzumab eine ideale Therapieoption dar. Etablierte Kombinationstherapien aus Trastuzumab mit einem herkömmlichen Chemotherapeutikum sind begrenzt und stehen bei der intensiv vortherapierten Patientin meist nicht mehr zu Verfügung.

Die Etablierung neuer Kombinationspartner ist daher ein vorrangiges Ziel zur Behandlung dieser Patientinnen.

Capecitabine, eine neues tumoraktiviertes orales Fluoropyrimidin weist bei Vortherapie mit Taxanen und Anthracyclinen eine hohe Antitumoraktivität auf^{44,45, 46}. Capecitabine bildet 5-Fluorouracil (5-FU) unter Mitwirkung der in Tumorgewebe verstärkten Thymidinphosphorylase⁴⁷. Dabei hat Capecitabine eine akzeptable Verträglichkeit. Capecitabine wurde 2004 als Chemotherapeutikum bei Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom und Anthracyclin- und Taxanvortherapie zugelassen.

Aufgrund dieser Wirkmerkmale erscheinen Trastuzumab und Capecitabine als vielversprechende Kombinationspartner. Bisher wurde jedoch diese Kombination zurückhaltend eingesetzt, da in *in vitro* Experimenten eine Antagonisierung von Trastuzumab durch 5-FU auftrat⁴⁸. Dieser Antagonismus wurde jedoch im Maus Xenograft Modell nicht bestätigt⁴⁹.

Die Untersuchung der Verträglichkeit und Wirksamkeit einer Trastuzumab / Capecitabine Kombinationstherapie bei der intensiv vorbehandelten Mammakarzinompatientin erscheint zur Erweiterung des Therapiespektrums sehr sinnvoll und wurde in eine Phase II Studie untersucht.

3 Zielsetzung

In dieser Habilitationsschrift wurden Einflussgrößen der Metastasierung, ihre prognostische Bedeutung und ihre klinische Beeinflussbarkeit anhand der Intermediärfilamente des Zellskelettes sowie der Onkogenfamilie der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1-HER4 untersucht.

Ziel der Untersuchungen war die Klärung der folgenden Fragen:

- ob im Rahmen der malignen Transformation beim Mammakarzinom ein Wechsel der Intermediärfilamentausstattung der Tumorzelle stattfindet,
- welche Bedeutung eine Änderung dieser Zytoskelettbestandteile für das Tumorverhalten und die Prognose der Karzinome hat und
- ob ein Wechsel mit einer Überexpression des Onkoproteins HER2 zusammenhängt.

Desweiteren sollte geklärt werden,

- ob sich das Expressionsverhalten von HER1, HER2, HER3 und HER4 im Rahmen des Metastasierungsprozesses von Mamma- und Zervixkarzinom ändert
- und welche prognostische Bedeutung das Zusammenspiel der vier Rezeptoren hat.

Schließlich wurde im Rahmen der klinischen Beeinflussbarkeit die Fragen untersucht,

- ob ein HER2 Verlust in der Hirnmetastase eine Ursache für die fehlende Wirksamkeit des HER2-Antikörpers Trastuzumab bei zerebraler Metastasierung sein könnte
- ob im Myokard im Rahmen von Adaptationsprozessen des Herzens auf kardialen Stress etwa durch Anthracyclintherapie eine kompensatorisch verstärkte HER2 Expression nachgewiesen werden kann und ob eine Trastuzumab - vermittelte Blockade dieser Kompensationsmechanismen die Ursache der Kardiotoxizität von Trastuzumab bei Frauen mit Herzvorerkrankung oder Anthracyclintherapie sein könnte
- und ob eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab und Capecitabine eine neue Therapieoption bei Frauen mit intensiv-vorbehandeltem Mammakarzinom darstellt.

4 Eigene Arbeiten

4. 1 Schaller, G., **Fuchs, I.**, et. al.: Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer, Clin. Cancer Res. 1996; 2: 1879-1885

In dieser Studie wurde an 134 invasiv duktalem Mammakarzinomen sowie sechs etablierten Mammakarzinomzelllinien das Expressionsverhalten des Intermediärfilamentes K18 im Rahmen der Metastasierung sowie der Einfluss von K18 auf die Prognose der Mammakarzinome untersucht. Die Untersuchung erfolgte immunhistochemisch. Es wurde gezeigt, dass es im Rahmen der malignen Transformation zu einer signifikanten Suppression von K18 kommt.

Eine Keratin 18 Suppression war in den Zelllinien mit zunehmender Aggressivität, Invasivität und steigendem metastatischem Potential verbunden.

Diese Beobachtung bestätigte sich in der klinischen Studie an 134 Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinomen. In 112 der Tumore (83,5%) war eine Keratin 18 Suppression nachweisbar. Patientinnen mit Keratin 18 supprimierenden Tumoren hatten eine signifikant schlechtere Prognose als Patientinnen mit Erhalt der K18 Expression in den Tumoren. Die Mortalität über einen Krankheitsverlauf von 8 Jahren war 44,6% in der K18 negativen Gruppe versus 4,5% in der K18 positiven Gruppe ($p < 0,0009$). Keratin 18 erwies sich als unabhängiger Prognoseparameter in uni- und multivariater Analyse.

4. 2 **Fuchs, I. et al.**, The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 3415-3420

In dieser Studie wurde nach K18 der Einfluss der weiteren luminalen Keratine K8 und K19 sowie des mesenchymalen Vimentins auf das Metastasierungsverhalten und die Prognose von invasiv duktalem Mammakarzinomen untersucht. Darüber hinaus wurde ein möglicher Zusammenhang einer veränderten Intermediärfilamentausstattung mit dem humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) überprüft. Die Untersuchung erfolgte immunhistochemisch am Tumormaterial von 80 Mammakarzinompatientinnen sowie an sechs etablierten Mammakarzinomzelllinien mit steigendem malignem Potential. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zu Keratin 18 konnte eine signifikante Suppression auch für Keratin 8 in 72,5% und Keratin 19 in 65% nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten 21,2% der Tumore eine aberrante Expression des mesenchymalen Vimentins. In den Zelllinien war eine Suppression der physiologischen Keratine mit steigender Aggressivität und Invasivität verbunden. Die Zelllinie mit dem höchsten malignem Potential zeigte einen vollständigen Verlust der Keratinexpression zugunsten einer aberranten Expression von Vimentin. Auch in der klinischen Studie mit einer Verlaufsbeobachtung über 122 Monate war eine Suppression von K8 sowie eine Vimentin-Neuexpression mit einer signifikant schlechteren Prognose mit verkürzten Überlebensraten verbunden ($p < 0,004$, $p < 0,006$, resp.). Dabei war korreliert das Auftreten einer aberranten Vimentinexpression in den hochmalignen Tumoren signifikant mit einer Überexpression des Onkoproteins HER2 ($p < 0,0005$).

4. 3 Fuchs, I. et al. Epidermal growth factor receptor changes during breast cancer metastasis. Anticancer Res. 2006; 26: 4397-4402

Diese Studie untersucht des Expressionsverhaltens der vier humanen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1, HER2, HER3 und HER4 im Verlauf der Metastasierung beim Mammakarzinom mit ihrer prognostischen Bedeutung. An 48 primären Mammakarzinomen sowie den korrespondierenden Fernmetastasen aus Lunge, Leber, Knochen und Haut wurde das Expressionsprofil von HER1-HER4 bestimmt, um einen möglichen Verlust bzw eine Neuexpression der HER-Rezeptoren im Rahmen der Metastasierung nachzuweisen. Der Proteinnachweis von HER1-HER4 erfolgte immunhistochemisch. Für HER2 wurde darüber hinaus eine Genamplifikation durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) überprüft. Es zeigte sich, dass unabhängig von der Metastasenlokalisierung diskordante Expressionsmuster zwischen Primärtumor und Fernmetastase für HER1 und HER2 in 21%, für HER3 in 33%, für HER4 in 44% nachweisbar waren. Dabei konnte in der Fernmetastase sowohl eine Neuexpression wie auch ein Verlust des jeweiligen Rezeptors beobachtet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die prognostische Bedeutung der verschiedenen HER-Rezeptoren unterscheidet. Während eine Überexpression von HER1, HER2 und HER3 mit einer schlechten Prognose verbunden war, korrelierte eine Überexpression von HER4 mit einem günstigen Verlauf.

4. 4 Fuchs, I. et al. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma, *Anticancer Research* 2007;27: 959-963

Diese Studie untersucht das Expressionsverhalten und die prognostische Bedeutung der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren HER1-HER4 beim Zervixkarzinom. An 78 Plattenepithelkarzinomen der Zervix wurde eine HER1-HER4 Überexpression überprüft. Der Nachweis einer Überexpression erfolgte immunhistochemisch, bei HER2 mit den für das Mammakarzinom standardisierten Nachweismethoden. Darüber hinaus wurde für HER2 eine Genamplifikation durch FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) überprüft. In dieser Studie wurde ein positiver HER2 Status in 21,8% der Zervixkarzinome nachgewiesen und ist damit mit der Expressionsrate beim Mammakarzinom vergleichbar. Die Expressionrate von HER1 lag bei 63%, von HER3 bei 74,5% und von HER4 bei 79,5%. Signifikante Korrelationen zwischen den vier Rezeptoren waren nur zwischen HER1 und HER4 nachweisbar. Darüber hinaus wurde der Einfluss der HER Rezeptoren auf die Prognose der Zervixkarzinome untersucht. Es zeigte sich, dass sich auch beim Zervixkarzinom die prognostische Bedeutung der Rezeptoren unterschied. Während eine HER2 und HER3 Überexpression mit einer Prognoseverschlechterung verbunden war, korrelierte eine HER1 Überexpression signifikant mit einem günstigeren Krankheitsverlauf.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass weniger das Expressionsverhalten des einzelnen Wachstumsfaktorrezeptors allein, sondern vielmehr die Koexpression und Interaktion mit den übrigen HER Rezeptoren, insbesondere HER4 für die intrazelluläre Wirkung des Rezeptors und damit die Prognose entscheidend ist.

4. 5 Fuchs, I. et al. HER2 in Brain Metastases: Issues of Concordance, Survival, and Treatment. J Clin. Oncol. 2002, 20: 4130-4133

In dieser Studie wurde das Expressionsverhalten von HER2 Expression im Rahmen der Hirnmetastasierung im Hinblick auf die Effektivität von Trastuzumab bei Hirnmetastasen untersucht.

Tumormaterial von 45 Mammakarzinompatientinnen mit Hirnmetastasen wurde in die Studie eingeschlossen. In 29 der Fälle war der korrespondierende Primärtumor verfügbar. Die Bestimmung einer HER2 Überexpression erfolgte immunhistochemisch, die Genexpression wurde durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung bestimmt. Der Krankheitsverlauf der Patientinnen wurde im Median 51 Monate nachverfolgt.

Es konnte gezeigt werden, dass 35% der Hirnmetastasen eine HER2 Überexpression aufwiesen. HER2 überexprimierende Tumore zeigten eine frühere Fernmetastasierung (21 versus 35 Monate) sowie eine frühere Hirnmetastasierung (22 versus 48 Monate). Keine Unterschiede zeigte sich in der Überlebenszeit der Patientinnen nach Auftreten der Hirnmetastasierung in Abhängigkeit vom HER2 Status.

Vergleiche des HER2 Expressionsverhaltens zwischen Primärtumor und Hirnmetastase ergaben eine Konkordanz der Expressionsmuster in 97%. Nur in einem Fall konnte ein HER2-Verlust in der Hirnmetastase eines HER2 überexprimierenden Primärtumors gefunden werden. In allen anderen Fällen stimmten die Expressionsprofile von Primärtumor und korrespondierender Hirnmetastase überein. Vier der untersuchten HER2 positiven Patientinnen erhielten bei vorliegender Hirnmetastasierung eine Trastuzumab Therapie. Keine der vier Patientinnen zeigten ein objektives Ansprechen, jedoch drei einen Krankheitsprogress der Hirnmetastasen trotz objektiven Ansprechens extrazerebraler Metastasen. Eine weitere Patientin entwickelte progrediente Hirnmetastasen unter Trastuzumab. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz Vorhandenseins des Zielantigens HER2 in der Hirnmetastase eine Trastuzumab Antikörpertherapie bei Hirnmetastasen unwirksam zu sein scheint.

4. 6 Fuchs, I. et al. Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). *Breast Cancer Res. Treat.* 2003, 82: 23-8

Diese Studie untersucht die Fragestellung, ob die Trastuzumab vermittelte Kardiotoxizität aufgrund einer Blockade von protektiven und adaptiven Mechanismen bei Herzvorschädigung oder unter Therapie alkylierender Substanzen, welche durch HER2 und HER4 vermittelt werden, verursacht wird.

Sechzig Herzbiopsien von Patienten mit einem breiten Spektrum verschiedener akuter und chronischer Herzerkrankungen sowie Herzbiopsien von 35 Mammakarzinompatientinnen, davon 25 nach Vortherapie mit Anthracyclinen, sowie 10 Patientinnen nach Trastuzumabtherapie, wurden auf eine Expression von HER2 und HER4 untersucht. Der HER4 Nachweis erfolgte immunhistochemisch. Der Nachweis von HER2 erfolgte mit Hilfe der für das Mammakarzinom standardisierten immunhistochemischen Verfahren sowie mit Hilfe einer sensitiveren fluoreszenzverstärkten Cy 3 Färbung. Der HER2 Genachweis erfolgte durch FISH.

In 6 der 60 Herzbiopsien der kardialen Patienten konnte eine leichte HER2 Membranfärbung nachgewiesen werden. In vier Fällen war histologisch eine Myokardhypertrophie und in einem Fall eine akute Myokarditis nachweisbar. In keiner der 35 Herzbiopsien der Mammakarzinompatientinnen war eine HER2 Expression nachweisbar. Keine der Biopsien zeigte eine HER2 Genamplifikation. Alle Proben zeigten eine schwache HER4 Färbung. Keine der Proben zeigte eine starke HER4 Expression. Diese Ergebnisse schließen eine deutliche HER2/HER4 Expressionssteigerung als Adaptationsmechanismus auf kardialen Stress oder Herzschildigung aus. Damit erscheint eine Blockade protektiver HER2 Rezeptoren des Herzmuskels als Ursache der Kardiotoxizität des HER Antikörpers Trastuzumab unwahrscheinlich.

4. 7 Schaller, G. / **Fuchs, I.** (Equal Contribution) et al. Phase II Study with Capecitabine and Trastuzumab in HER2-overexpressing Metastatic Breast Cancer pretreated with Anthracyclines and/or Taxanes, J. Clin. Oncol. 2007; 25: 3246-3250

Diese Phase II Studie untersuchte die klinische Wirksamkeit und Verträglichkeit von Trastuzumab und Capecitabine als neue Kombinationspartner zur Therapie von Patientinnen mit fortgeschrittenem HER2 positiven Mammakarzinom und intensiver chemotherapeutischer Vorbehandlung. 27 Patientinnen mit Anthracyclin und /oder Taxan Vorbehandlung erhielten 1,250mg/m² Capecitabine oral für 14 Tage gefolgt von einer einwöchigen Pause. Dazu wurde Trastuzumab 4mg/kg Körpergewicht i.v. am Tag 1 kombiniert gefolgt intravenöse Gaben von 2 mg /kg Körpergewicht in wöchentlichem Intervall.

In der Intent-to-Treat-Analyse wurde durch die Trastuzumab/Capecitabine-Kombinationstherapie bei 12 Patientinnen (45%) ein objektives Ansprechen nachgewiesen. Davon zeigten vier Patientinnen (15%) eine Komplettremission, acht Patientinnen (30%) eine Partialremission und 9 Patientinnen (33%) eine Krankheitsstabilisierung. Das Gesamtüberleben war 28 Monate mit einem medianen progressionsfreien Intervall von 6,7 Monaten. Das Nebenwirkungsprofil dieser Kombinationstherapie war günstig und beherrschbar mit einer niedrigen Inzidenz höhergradiger Toxizitäten. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Schmerzen sowie gastrointestinale Nebenwirkungen. Daher kann die Kombinationstherapie aus Trastuzumab und Capecitabine als eine effektive und gut verträgliche Therapiemöglichkeit bei Frauen mit HER2 überexprimierendem Mammakarzinom nach intensiver Vortherapie mit Anthracyclinen oder Taxanen angesehen werden.

5 Diskussion

Der erste Abschnitt dieser Habilitationsschrift untersucht die Änderungen des Zytoskeletts der Tumorzelle als Voraussetzung einer Metastasierung beim Mammakarzinom. An sechs etablierten Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7, MCF-7-LCC2, ZR 15-1, MDA 453, MDA 435, MDA 231) wurde gezeigt, dass mit steigender Aggressivität und wachsendem metastatischem Potential ein schrittweiser Verlust der physiologischen luminalen Keratine K8 und K18 über K19 zugunsten einer aberranten Expression des mesenchymalen Vimentins stattfindet (Schaller, Fuchs et al., Clin Cancer Res 1996, Fuchs et al, Anticancer Res 2002). Diese in vitro Beobachtungen wurden in klinischen Studien bestätigt. Bei Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinom war eine Suppression von K8 in 72,5% und von K18 in 85,6% der Primärtumore nachweisbar. Eine Keratin 8/18 Suppression war im klinischen Verlauf mit einer signifikant erhöhten Metastasierungsrate und einer immensen Prognoseverschlechterung verbunden. Dagegen wurde in 21,3% der Tumore das epithelfremde Intermediärfilament Vimentin exprimiert. Karzinome mit aberranter Vimentinexpression hatten sowohl in den Zelllinien als auch im klinischen Verlauf die höchste Metastasierungsrate und schlechteste Prognose. Vimentin stellt physiologischerweise das Intermediärfilament mesenchymaler Zellen wie Blutzellen dar und wird in Epithelien nicht exprimiert⁵. Der beobachtete Wechsel der Intermediärfilamente weg von Keratin 8 und 18 hin zum mesenchymalen Vimentin weist auf verbesserte mechanische Voraussetzungen für eine Ablösung der Zellen aus dem Zellverband, Absiedelung in Blut- und Lymphgefäße und damit der Fernmetastasierung hin. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Autoren nicht nur beim Mammakarzinom^{50,51}. Auch in hochmalignen Pankreaskarzinomen beobachtete Pankov et al. einen Verlust der Keratinexpression mit aberranter Expression von Vimentin. Im Tierexperiment gelang den Autoren eine Transfektion von K8 und K18 in diese hochmalignen vimentin-positiven Karzinome⁵². Die transfizierten Tumore zeigten eine drastische Abnahme der Tumorbildung und Metastasenbildung. Die Untersuchungen des Intermediärfilamentwechsels beim Mammakarzinom haben direkte klinische Relevanz:

In den vorliegenden Studien kam es bei Erhalt der physiologischen Keratinausstattung K8 und K18 im Karzinom in über 95% zu keiner Fernmetastasierung. Daher scheint der K8/K18-Nachweis im Karzinom einen möglichen „günstigen“ Prognoseparameter zur Vorhersage einer guten Prognose darzustellen. Derzeit werden in der klinischen Routine fast ausschließlich „ungünstige“ Prognoseparameter zur Risikoeinstufung einer Patientin eingesetzt. Dies erscheint bei verschiedenen Patientinnengruppen, etwa bei der jungen nodal-negativen Patientin mit kleinen Karzinomen kritisch. Allein aufgrund des Alters (<35J.) werden nach den St. Gallen Konsensus Kriterien⁵³ diese Frauen in die Gruppe mit intermediärem Risiko eingestuft und erhalten die Empfehlung einer adjuvanten Therapie. Tatsächlich entwickelt jedoch ein Großteil dieser Frauen im Langzeitverlauf keine Fernmetastasen⁵⁴. „Günstige“ Prädiktoren werden dringend benötigt, um das individuelle Risiko einer Patientin besser bestimmen und eine Übertherapie vermeiden zu können.

Der Keratinnachweis wird derzeit in der klinischen Routine zur Identifikation von Mikrometastasen etwa im Knochenmark angewendet⁷. Unsere Ergebnisse verdeutlichen die Problematik, dass bei diesen Verfahren gerade die hochmalignen vimentin-positiven Tumorzellen im Knochenmark nicht identifiziert werden, da diese sich immunhistochemisch nicht von den vimentin-positiven Blutzellen unterscheiden. Zum anderen können falsch-negative Befunde gerade bei entdifferenzierten Karzinomen nicht ausgeschlossen werden. Diese Problematik sollte bei der Verwendung dieser Techniken berücksichtigt werden.

Schließlich geben die Experimente beim Pankreaskarzinom auch beim Mammakarzinom eine Perspektive der Beeinflussbarkeit des Tumorverhaltens. Ließe sich eine Keratin 8 und 18 Suppression beim entdifferenzierten Mammakarzinom aufheben, ließe sich dadurch möglicherweise das Metastasierungsverhalten der Karzinome günstig beeinflussen.

Aus diesen Studien erwuchs die Fragestellung, wodurch die Expression der Intermediärfilamente beeinflusst wird. Unter physiologischen Bedingungen nehmen epidermale Wachstumsfaktorliganden auf die Regulation der Intermediärfilamentexpression Einfluss.

Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang auch im Karzinom. Wir konnten zeigen, dass der Wechsel der Intermediärfilamente vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp mit einer Überexpression von HER2 korreliert. HER2 überexprimierende Karzinome supprimierten in der Mehrzahl die physiologischen Keratine 8 und 18. Stattdessen war in den hochmalignen HER2 positiven Karzinomen bevorzugt eine Expression von Vimentin nachweisbar. Vimentin/HER2 positive Tumore zeigten das höchste Metastasierungspotential und im klinischen Verlauf die schlechteste Prognose.

Mit weiterführenden Untersuchungen dieses wachstumsregulierenden Onkogens HER2, sowie der Partnerproteinen HER1, HER3 und HER4 im Rahmen der Metastasierung und deren prognostischer Bedeutung beschäftigt sich der zweite Abschnitt dieser Habilitationsschrift.

Es wurde gezeigt, dass sich beim Mammakarzinom der prognostische Einfluss der verschiedenen HER Rezeptoren unterscheidet. Während eine Überexpression von HER1, HER2 und HER3 mit einer schlechten Prognose verbunden ist, zeigen Karzinome mit einer HER4 Überexpression einen signifikanten Überlebensvorteil. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nicht in allen Karzinomen die HER1-HER4 Ausstattung des Primärtumors dem HER-Profil der Fernmetastase entspricht. Diskordante Expressionsprofile zwischen Primärtumor und Fernmetastase waren für HER1 und HER2 in 21%, für HER3 in 33% und für HER4 in 44% nachweisbar. Dabei war sowohl eine Neuexpression von HER in der Metastase eines HER-negativen Karzinoms wie auch um Verlust von HER eines vormals HER-positiven Karzinoms zu beobachten.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich folgende klinische Konsequenzen:

Wie bereits beschrieben wird der prädiktive HER2 Nachweis zur Planung einer Trastuzumab Therapie am Primärtumor und nicht am Metastasenmaterial direkt durchgeführt. Nach den Ergebnissen der aufgeführten Studie ist dies in der Mehrzahl der Fälle ausreichend, da in 80% der Fälle das HER2 Expressionsmuster von Primärtumor und Metastase übereinstimmen. Jedoch ist in Fällen mit HER2 negativem Primärtumor und progressiver Fernmetastasierung eine HER2 Evaluation auch im metastatischen Material zu erwägen, um eine mögliche HER2 Neuexpression in der Metastase zu identifizieren und so diesen Patientinnen die Therapieoption mit dem

effektiven HER2 Antikörper Trastuzumab zugänglich zu machen. Darüber hinaus ist ein Verlust von HER2 in der Fernmetastase eine Erklärung für das fehlende Ansprechen mancher hochmaligner Karzinome auf eine Trastuzumabtherapie trotz nachgewiesener HER2 Überexpression und Genamplifikation im Primärtumor sein.

Dieses Vorgehen trifft auch für die weiteren HER Rezeptoren bei Therapie mit spezifischen HER gerichteten Antikörpern zu.

Die Beobachtung der unterschiedlichen prognostischen Bedeutung von HER1-HER3 im Vergleich zu HER4 erzwingt Vorsicht beim Einsatz neuer Antikörper. Derzeit sind pan-HER Antikörper, die alle vier HER Rezeptoren gemeinsam blockieren, in der klinischen Erprobung. Diesem Therapieansatz liegt die Annahme zugrunde, dass alle Rezeptoren eine schlechte Prognose vermitteln und sich daher die Antitumor-Wirkung potenziert. Ungeklärt ist, welche Auswirkungen die Blockade des prognostisch günstigen HER4's auf den Krankheitsverlauf der betroffenen Patientinnen hat. Vor dem Einsatz derartiger neuer Therapieformen erscheint die Bestimmung nicht nur von HER2, sondern von allen HER Proteinen, insbesondere HER4 sinnvoll.

Anders als beim Mammakarzinom ist die Datenlage zum Expressionsverhalten von HER2 im Zervixkarzinom widersprüchlich. Während manchen Studien hohe HER2 Expressionsraten - meist mit Hilfe nicht-standardisierter Nachweismethoden beschreiben, weisen andere Autoren HER2 nur in einem sehr geringen Prozentsatz der Zervixkarzinome nach. Kenntnisse über das Expressionsverhalten der weiteren Rezeptoren HER1, HER3 und HER4 sind insgesamt begrenzt.

Zur Klärung der Expressionsraten von HER1-4 im Zervixkarzinom und der zugehörigen prognostischen Bedeutung wurde eine Studie an 78 Plattenepithelkarzinomen der Zervix durchgeführt. Mit Hilfe der für das Mammakarzinom standardisierten Nachweisverfahren fanden wir eine HER2 Überexpressionsrate von 21,8%. Daneben fanden wir eine Expression von HER1 in 63%, von HER3 in 74,4% und von HER4 in 79,5%.

Überlebensanalysen ergaben eine Assoziation von HER2 und HER3 mit einer schlechten Prognose. Dagegen war eine HER1 Expression erstaunlicherweise mit einem Überlebensvorteil assoziiert. Korrelationsanalysen zeigten eine signifikante Koexpression zwischen HER1 und HER4.

Unsere Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass für die spezifische intrazelluläre Funktion und damit die prognostische Bedeutung eines HER-Rezeptors nicht nur das

Vorhandensein des jeweiligen Rezeptors selbst, sondern vielmehr das Zusammenspiel mit den anderen Rezeptoren, insbesondere HER4 von großer Bedeutung ist. Die Ergebnissen unserer Studie unterstützen die Beobachtungen anderer Autoren, welche beim Zervix- und Blasenkarzinom nachweisen konnten, dass die prognostischen Bedeutung von HER1 und HER2 vom Koexpressionsverhalten mit HER3 und HER4 abhängig ist: Bei Koexpression mit HER4 zeigte sich in diesen Studien eine Änderung der prognostischen ungünstigen Wirkung der Rezeptoren HER1 und HER2: HER1/HER4 und HER2/HER4 koexprimierende Tumore wiesen eine niedrige Aggressivität und einen günstigen Krankheitsverlaufs auf.

Wir fanden unter Verwendung der beim Mammakarzinom üblichen standardisierten Nachweisverfahren in dieser Studie beim Zervixkarzinom eine vergleichbare Expressionsrate wie beim Mammakarzinom von 21,8%. Nach unseren Ergebnissen erscheinen daher prospektive Studien mit prädiktiver HER2-Bestimmung notwendig, um einen Therapieversuch mit Trastuzumab beim HER2 positiven Zervixkarzinom zu ermöglichen.

Wie bereits beim Mammakarzinom beschrieben, erscheint auch beim Zervixkarzinom eine Bestimmung des gesamten HER-Status sinnvoll, bevor therapeutische Interventionen, insbesondere bei Verwendung von pan-HER Antikörpern erwogen werden, da für das spezifischen Tumorverhalten das Expressionsprofil aller HER Rezeptoren von Bedeutung ist und nicht die Expression des einzelnen HER-Rezeptors allein. Eine negative Beeinflussung des Tumors durch Blockade von HER4 erscheint nicht ausgeschlossen.

Schließlich werden in dieser Arbeit die Grenzen, Probleme und Möglichkeiten einer klinischen Beeinflussbarkeit der HER2 überexprimierenden Tumore anhand der spezifischen HER2-Antikörpertherapie mit Trastuzumab untersucht. Hierbei wurde auf drei Fragenstellungen eingegangen:

Der fehlenden Wirksamkeit von Trastuzumab bei Hirnmetastasierung, der ungeklärten Kardiotoxizität von Trastuzumab und neue Kombinationsmöglichkeiten von Trastuzumab und Capecitabine beim intensiv vorbehandelten metastasierten Mammakarzinom.

In 45 Hirnmetastasen sowie in 29 korrespondierenden primären Mammakarzinomen wurde der HER2 Status durch Immunhistochemie und FISH in standardisiertem Verfahren bestimmt.

Wir konnten zeigen, dass die HER2 Expressionsrate von 35,5% in den Hirnmetastasen der erwarteten Expressionsrate beim extrazerebralen Mammakarzinom entspricht. Im klinischen Verlauf zeigte sich, dass HER2 positive Tumore eine Tendenz zur frühen Hirnmetastasierung aufwiesen. Die Konkordanz von Primärtumor und Hirnmetastase war in dieser Studie 97% mit ausgesprochen hoch.

Unsere Studie zeigt, dass die Tumorausstattung in der Hirnmetastase weitgehend der des Primärtumors entspricht, was bedeutet, dass in der Hirnmetastase das Zielantigen für eine spezifische Trastuzumab-Therapie vorhanden ist. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise, dass gerade in HER2 überexprimierenden Karzinomen eine Hirnmetastasierung frühzeitig auftritt, so dass hier eine Intervention mit Trastuzumab günstig wäre. Fallbeobachtungen aus unserem Studienkollektiv zeigen jedoch, dass Trastuzumab trotz nachgewiesener HER2 Überexpression in der Hirnmetastase keine Wirksamkeit zeigt. Fünf der Studienpatientinnen erhielten Trastuzumab ohne objektives Ansprechen der Hirnmetastasen. Dabei zeigten drei Frauen mit Therapiebeginn von Trastuzumab bei bereits vorliegender Hirnmetastasierung einen Krankheitsprozess der zerebralen Metastasen bei gleichzeitig objektivem Ansprechen extrazerebraler Metastasen. Eine Patientin entwickelte die Hirnmetastasierung unter laufender Trastuzumabtherapie. Da HER2 als Ziel-Antigen nachweislich vorhanden war, scheint die fehlende Wirksamkeit auf eine gestörte Antigen-Antikörper-Reaktion zurückzuführen zu sein, möglicherweise aufgrund einer Blockade durch die Blut-Hirnschranke. Die Gabe von Trastuzumab in einer veränderten Applikationsform e.g. intrathekale Gabe wie kürzlich von Stemmler et al.⁵⁵ beschrieben, erscheinen aufgrund der Ergebnisse die einzige sinnvolle Applikationsform von Trastuzumab bei Vorliegen von Hirnmetastasen. Ein Vorteil der Therapie mit Trastuzumab gegenüber herkömmlichen Chemotherapien liegt insbesondere in seiner exzellenten Verträglichkeit. Eine der wenigen problematischen Nebenwirkung ist eine Kardiotoxizität ungeklärter Ursache bei Patientinnen mit Anthracyclin-Vorbehandlung oder Herzvorerkrankung. Bekannt ist, dass HER2 und HER4 eine essentielle Rolle bei der embryonalen Kardiogenese und bei der Kardioprotektion spielt. Interessant sind insbesondere Studien, die bei Mäusen mit kardioselektiven HER2 Deletion die Entwicklung einer Kardiomyopathie mit Kammerdilatation, Myokardverlust und Abnahme der Kontraktilität nachwiesen. Die Kardiomyocyten dieser Mutanten zeigen eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der

Kardiotoxizität alkylirender Substanzen⁴¹. Darüber hinaus ist bei dem Übergang einer kompensierten Herzhypertrophie in ein Herzversagen ein Verlust der kardialen HER2 und HER4 Expression zu beobachten⁴².

Daher ist eine viel diskutierte Hypothese, dass als Adaptation des Herzens auf eine Noxe wie den Anthracyclinen oder unspezifische Schädigung eine Hochregulierung von HER2 im Herzmuskel stattfindet. Diese notwendige Adaptation würde dann durch eine HER2 Blockade mit Trastuzumab gehemmt, was die klinisch beobachtete Kardiotoxizität verursachen könnte.

Sechzig Herzbiopsien von Patienten mit einem breiten Spektrum verschiedener Herzerkrankungen und histologischer Myokardveränderungen wurden auf eine Expression von HER2 und HER4 untersucht. Darüber hinaus wurde Myokard von 35 Brustkrebspatientinnen mit einer Vorbehandlung mit Anthracyclinen (n = 25) und Trastuzumab (n= 10) analysiert. Der HER2 Proteinnachweis erfolgte mit dem für HER2 standardisierten immunhistochemischen Nachweisverfahren sowie durch eine ausgesprochen sensitive CY3 Fluoreszenzfärbung. Der Gen-Nachweis erfolgte durch FISH. HER4 wurde immunhistochemisch untersucht. Wir konnten eine leichte HER2 Expression lediglich in sechs Herzbiopsien mit histologischem Nachweis einer Herzhypertrophie bzw. einer kardialen Fibrose nachweisen. In allen übrigen Herzbiopsien und im Myokard der Mammakarzinompatientinnen ließ sich auch mit der sensitiven CY3 Fluoreszenzfärbung keine signifikante HER2 Expression nachweisen. Alle Proben zeigten eine moderate Expression von HER4.

Da in dieser Studie sowohl ein sehr breites Spektrum myokardialer Krankheitsbilder als auch Myokard nach Vorbelastung durch Anthracyclin- oder Trastuzumabtherapie untersucht wurde, kann die Hypothese einer Hochregulation von HER2 und HER4 als Adaptionsmechanismen des Myokards auf Schädigung durch toxische Substanzen, durch Stress oder aufgrund degenerativer Prozesse widerlegt werden. Nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen ist das Vorliegen einer minimalen kardialen HER2 Expression unter der Nachweisgrenze der angewandten Methoden. Der geringe HER2 Nachweis in sechs Biopsien könnte bereits eine minimale Zunahme der HER2 Expression bedeuten. Unklar ist, welche HER2 Expressionsstärke im Myokard notwendig ist, um bei Blockade eine klinisch bedeutsame Reaktion hervorzurufen. Darüber hinaus kann eine vorübergehende HER2 Hochregulation nicht ausgeschlossen werden.

Bis diese Fragestellung geklärt ist, muss weiterhin ein zurückhalternder Einsatz von Trastuzumab bei Patientinnen mit Herzvorerkrankung empfohlen werden. Daneben sollte die wirksame Anthracyclin-Trastuzumab Kombinationstherapie zumindest außerhalb klinischer Studien vermieden werden.

Die Kombinationsmöglichkeiten von Chemotherapeutika mit Trastuzumab sind gerade bei Patientinnen mit aggressiven HER2 positiven Karzinomen und intensiver chemotherapeutischer Vorbehandlung ausgesprochen begrenzt. Wir untersuchten bei 27 Patientinnen mit HER2 positivem Mammakarzinom und progredienter Fernmetastasierung nach Taxan und /oder Anthracyclin Vorbehandlung eine Kombinationstherapie aus Capecitabine und Trastuzumab als neue Therapieoption. Die Patientinnen erhielten zweimal täglich 1,250 mg/m² orales Capecitabine für 14 Tage gefolgt von einer einwöchigen Pause in Kombination mit intravenösem Trastuzumab mit einer 4 mg/kg Anfangsdosis gefolgt von 2 mg/kg Erhaltungsdosis in ein-wöchentlichen Intervallen. Unter Capecitabine/Trastuzumab-Kombinationstherapie wurden objektive Ansprechraten bei 12 Patientinnen (45%, intent to treat) beobachtet. Dabei zeigten sich ein komplettes Ansprechen bei 4 Patientinnen (15%, intent to treat), partielles Ansprechen bei acht Patientinnen (30%, intent to treat) und eine Krankheitsstabilisierung in neun Patientinnen (33%, intent to treat). Das mediane Gesamtüberleben war 28 Monate mit einem medianen progressionsfreien Intervall von 6,7 Monaten. Die allgemeine Verträglichkeit war sehr gut, Grad 3-4 Toxizitäten waren selten. Die häufigsten Nebenwirkungen (Schmerzen, Hand -und Fußsyndrome und gastrointestinale Nebenwirkungen) waren beherrschbar. Eine Alopezie trat nicht auf. Diese Ergebnisse erscheinen vielversprechend, da das in diese Studie eingeschlossene Kollektiv von Frauen mit Tumorprogression nach Anthracyclin und Taxantherapie und damit minimaler Erfolgsaussicht einer systemischen Therapie. Viele dieser Patientinnen erlitten unter den vorangegangenen Therapien schwere Nebenwirkungen, allen voran eine hochgradige Myelosuppression, die einen Therapieabbruch notwendig machte. In dieser Phase II Studie konnte in einem derartig problematischen Kollektiv überzeugende Ansprechraten unter Erhalt der Lebensqualität mit beherrschbaren Nebenwirkungen erreicht werden. Darüber hinaus konnten wir in dieser Phase II Studie in *in vitro* Beobachtungen widerlegen⁴⁷, welche eine Antagonisierung von Trastuzumab durch 5-FU nahe legten. Diese Studie konnte zeigen, dass Kombinationstherapie aus

Trastuzumab und Capecitabine eine effektive Therapieoption beim fortgeschrittenen, stark vorbehandelten HER2 positiven Mammakarzinom darstellt.

6 Danksagung

Zu aller erst möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Schaller zutiefst danken. Prof. Schaller hat mich an die experimentelle Forschung herangeführt. Es gelang ihm, meine Begeisterung für wissenschaftliche Fragen zu wecken. Er hat mich durch seine visionäre Herangehensweise und erstaunlichen Ideen sehr beeinflusst.

Herrn Prof. J.W. Dudenhausen möchte ich danken, dass er mir die Gelegenheit gibt, meine Habilitation beim ihm durchzuführen und mich in diesem Vorhaben bestärkt und unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Kaczmarczyk. Durch Ihre Förderung im Rahmen eines Rahel-Hirsch-Stipendiums hat Sie mir die notwendigen Freiräume für meine Forschungstätigkeit geschaffen hat.

Dann möchte ich mich bei Prof. Dr. W. Henrich, Prof. K. Nicolaidis und den vielen Mitgliedern der verschiedenen Arbeitsgruppen und bei allen Doktorandinnen sehr bedanken, die selbständig und mit viel Ausdauer die diversen Themen bearbeitet haben und ohne die diese Arbeit nicht zustanden gekommen wäre. Besonders möchte ich dabei Ildiko Siemer, Solveig Landt, Maren Löbbcke, Nana Vorsteher, Katja Evers und Heike Müller hervorheben.

Bei Herrn Prof. W. Lichtenegger möchte ich für meine klinische Ausbildung in seiner Klinik danken.

Dann möchte ich mich bei Herrn J. Pachaly für seine langjährige Unterstützung bei Fragen zu komplexen statistischen Sachverhalten bedanken.

Natürlich gebührt meinen Kolleginnen ein großer Dank, insbesondere Frau Dr. Annette Schmieder-Ross als meiner Mitstreiterin.

Und schließlich, möchte ich mich bei meiner gesamten Familie und allen meinen herausragenden Freunden bedanken.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Steinert, P.M., Roop, D.R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; 57: 593-623
- ² Moll, R, et al. The catalog of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24
- ³ Eichner, R. et al. The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 1986; 102: 1767-1777
- ⁴ Moll, R.: Cytokeratins as markers of differentiation: expression profiles in epithelial tumors, Gustav Fischer Stuttgart, 1993
- ⁵ Evans, R.M. Vimentin – the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays* 1998; 29: 79-86
- ⁶ Debus, E. et al. Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am. J. Path.* 1984; 114: 121-130
- ⁷ Pantel, K. et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 1419-1424
- ⁸ Reynolds, C. et al. Sentinel lymph node biopsy with metastasis: can axillary dissection can be avoided in some patients with breast cancer? *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 1720-1726
- ⁹ Wingren, S. et al. S-phase determination of immunoselected cytokeratin-containing breast cancer cells improves the prediction of recurrence. *Breast. Cancer Res. Treat.* 1994; 29: 179-187
- ¹⁰ De Potter, I.Y. et al. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp. Cell Res.* 2001; 271: 315-328
- ¹¹ Padhy, L.C. et al. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 28 ; 865-871 : 1982
- ¹² Lee, K.F. et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; 378: 394-398
- ¹³ Salomon, D.S. et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1995; 19: 183-232
- ¹⁴ Slamon, D.J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182
- ¹⁵ Suo, Z. et al. EGFR family expression in breast carcinomas. C-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J. Pathol* 2002; 196: 17-25

-
- ¹⁶ Guy, P.M. et al. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 8132-8136
- ¹⁷ Pinkas-Kramarski, R. et al. Diversification of NEU differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 1996; 15: 2452-2467
- ¹⁸ Duneau, J.P. et al., A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Biochemistry* 2007; 46: 2010-2019
- ¹⁹ Rubin, I., Yarden, Y. The basic biology of HER2. *Ann. Oncol.* 2001; 12, Suppl 1: S3-S8
- ²⁰ Tzahar, E. et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 1996; 16: 5276-5287
- ²¹ Tsutsui, S. et al. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer. *Clin. Cancer Res* 2002; 8: 3454-3460
- ²² Abd El-Rehim, D.M. et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 2004; 91: 1532-1542
- ²³ Witton, C.J. et al. Expression of HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol.* 2003; 200: 290-297
- ²⁴ Yakes, F.M. et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 2002; 62: 4132-4141
- ²⁵ Lane, H.A. et al. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 3210-3223
- ²⁶ Izumi, Y. et al. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002; 416: 279-280
- ²⁷ Clynes, R.A. et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 2000; 6: 443-446
- ²⁸ Vogel, C.L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol* 2002; 20: 719–726
- ²⁹ Slamon, D.J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:783–792
- ³⁰ Cobleigh, M.A. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 2639-2648

-
- ³¹ Dybdal, N. et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trial by immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res. Treat.* 2005; 93: 3-11
- ³² Goldstein, N.I. et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1311-1318
- ³³ Yang, X.D. et al. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001; 38: 17-23
- ³⁴ Yang, X.D. et al. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res.* 1999; 59: 1236-1243
- ³⁵ Pedersen, M.W. et al. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann. Oncol.* 2001; 12: 745-760
- ³⁶ Posner, J.B. Brain metastases: 1995. A brief review. *J Neurooncol* 1996; 27: 287-93
- ³⁷ Hietanen P. et al. Survival after first recurrence in breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1986; 22: 913-919
- ³⁸ Pestalozzi, B.C., Brignoli, S. Trastuzumab in CSF. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2350-2351
- ³⁹ Lower, E.E. et al. Increased brain metastasis detected in metastatic breast cancer patients receiving herceptin. *Breast Cancer Res. Treat.* 2001; 69: 271 (abstr 357)
- ⁴⁰ Lee, K.F. et al. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; 378: 394-398
- ⁴¹ Zhao, Y.Y. et al. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 10261-10269
- ⁴² Crone, S. A. et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nature Med.* 2002; 8: 459-465
- ⁴³ Chien, K.R. Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999; 98: 555-558
- ⁴⁴ O'Shaughnessy, J. et al. Superior Survival With Docetaxel/Capecitabine Combination Therapy in Anthracycline-Pretreated Patients With Advanced/Metastatic Breast Cancer: Phase III Trial Results. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2812-2823
- ⁴⁵ O'Shaughnessy, J. et al. Randomized, open-label, phase II trial of oral capecitabine (Xeloda[®]) vs. a reference arm of intravenous CMF (cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil) as first-line therapy for advanced/metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 2001; 12: 1247-1254

-
- ⁴⁶ Talbot, D. et al. Randomised, phase II trial comparing oral capecitabine (Xeloda[®]) with paclitaxel in patients with metastatic/advanced breast cancer pretreated with anthracyclines. *Br. J. Cancer* 2002; 86: 1367–1372
- ⁴⁷ Miwa, M. et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer* 1998, 34: 1274–1281
- ⁴⁸ Pegram, M. et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999; 18: 2241–2251
- ⁴⁹ Fujimoto-Ouchi, K. et al. Antitumor activity of combinations of anti-HER-2 antibody trastuzumab and oral fluoropyrimidines capecitabine/5'-dFUrd in human breast cancer models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002; 49: 211–216
- ⁵⁰ Franzen, B. et al. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down regulation of cytokeratins. *Br J Cancer* 1996; 73: 1632-1638
- ⁵¹ Takei, H. et al. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 8 as a prognostic factor in invasive breast carcinoma. *Anticancer Res* 1995; 15: 1101-1105
- ⁵² Pankov, R. et al. Contrasting effects of K8 and K18 on stabilizing K19 expression, cell motility and tumorigenicity in the BSp73 adenocarcinoma. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 965-974
- ⁵³ Goldhirsch, A. et al. Meeting highlights: the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 1569-1583
- ⁵⁴ Tai, P. et al. Modeling the effect of age in T1-2 breast cancer using the SEER database. *BMC Cancer* 2005; 5: 130
- ⁵⁵ Stemmler, H.J. et al. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 23-28

Erklärung

§ 4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin

Ilka Fuchs