

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gesamtüberleben

Das endgültige Patientinnenkollektiv bestand aus 78 Patientinnen. Die Frauen waren zwischen 24 und 89 Jahren alt, der Median lag bei 50 Jahren. Aufgeschlüsselt nach Krankheitsstadium (FIGO) und Grading ergibt sich folgende Verteilung:

32 Patientinnen FIGO I, 22 Patientinnen FIGO II, 17 Patientinnen FIGO III und 7 Patientinnen FIGO IV.

Aufgeteilt nach dem Grading fanden sich im Kollektiv 37 niedrig differenzierte (Grading 3), 41 mäßig differenzierte (Grading 2) und keine hochdifferenzierten Karzinome (Grading 1).

<b>FIGO-Stadium</b>	<b>Häufigkeit (n)</b>
I	32
II	22
III	17
IV	7
<b>Grading</b>	
1	0
2	41
3	37
<b>Lymphknotenstatus</b>	
0	39
1	11
unbekannt	28

**Tabelle 4: Charakteristika des Kollektivs**

Hinsichtlich der Therapie stellt sich das Kollektiv wie folgt dar: 2 Patientinnen erhielten gar keine Therapie, 26 wurden primär einer Strahlentherapie (Afterload, perkutane Bestrahlung oder beides) zugeführt. 50 Patientinnen wurden zunächst operativ behandelt, wobei sich bei 11 Patientinnen eine Radiatio anschloss (22 Prozent) und bei 3 Patientinnen eine Chemotherapie (6 Prozent).

### 3.1.1 Aufschlüsselung der Todesursachen

Von den 78 Patientinnen starben im Beobachtungszeitraum von 156 Monaten 26. 21 Patientinnen (27 Prozent) starben am Karzinom von denen 20 bereits nach fünf Jahren verstorben (95 Prozent) waren, acht davon im ersten Jahr nach der Diagnose, weitere sieben im zweiten Jahr. Eine Patientin jedoch starb erst nach 12 Jahren. Die mediane Überlebenszeit betrug 60 Monate nach Erstdiagnose. 5 Patientinnen starben an anderen Ursachen. Die Patientinnen bei denen die Todesursache nicht zu erheben war, schieden aus.

**STATUS**

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig lebend ohne Hinweis auf Tumor	52	66,7	66,7	66,7
am Tumor verstorben	21	26,9	26,9	93,6
andere Todesursachen	5	6,4	6,4	100,0
Gesamt	78	100,0	100,0	

**Tabelle 5: Aufschlüsselung der Todesursachen im Beobachtungszeitraum von 156 Monaten**

### 3.1.2 FIGO-Stadien und Gesamtüberleben

Von den 32 Patientinnen im FIGO-Stadium I starben zwei (6,7 Prozent), davon eine (3,3 Prozent) am Karzinom und eine an anderen Ursachen. Die mittlere Überlebenszeit betrug 174 Monate.

Von 22 Patientinnen im FIGO-Stadium II starben vier (18,2 Prozent), davon drei (13,7 Prozent) am Tumor. Die mittlere Überlebenszeit war 128 Monate.

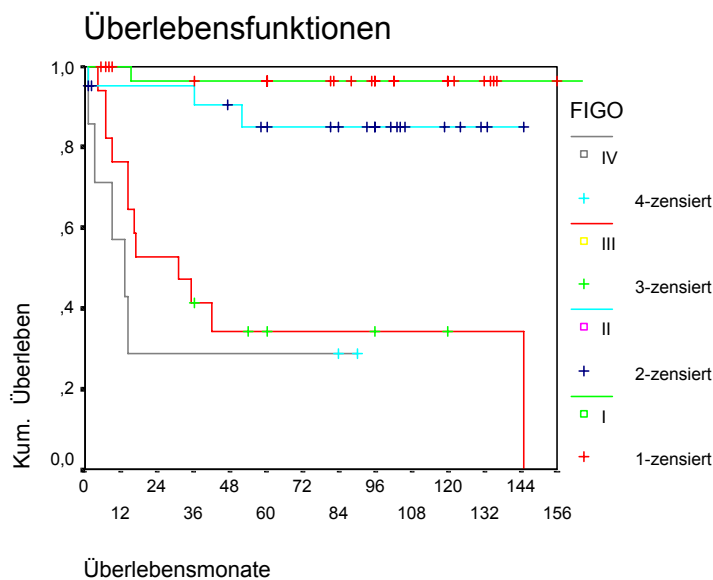
Von den 17 Patientinnen im FIGO-Stadium III starben 15 (88,2 Prozent), wobei zwölf (70,6 Prozent) am Tumor verstarben, hier überlebten die Patientinnen im Durchschnitt nur noch 62 Monate.

Im FIGO-Stadium IV waren zum Zeitpunkt der Diagnose 7 Patientinnen, von diesen starben im Beobachtungszeitraum 5 (71,4 Prozent) und diese verstarben alle am Tumor (100 Prozent). Die mittlere Überlebenszeit betrug für diese Patientinnen nur noch 31 Monate.

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den höheren FIGO-Stadien III und IV und einer schlechteren Prognose ( $p < 0,001$ ).

Betrachtet man das Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium nach FIGO in der Kaplan Meier Kurve (s. Abbildung 1), so unterscheiden sich die Überlebenskurven für die FIGO I und FIGO II Karzinome zusammengefasst höchst signifikant von denen für die FIGO III und IV Karzinome ( $p < 0,001$ ).

Die FIGO-Stadien I und II unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, gleiches gilt für die FIGO-Stadien III und IV.



**Abbildung 1: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium**

### 3.1.3 Grading und Gesamtüberleben

Im Kollektiv gab es nur Patientinnen mit einem histologischen Grading von 2 oder 3.

Von den 41 Patientinnen mit G2-Karzinomen starben 14 (34,1 Prozent), davon 12 (29,3 Prozent) am Karzinom und 2 an anderen Ursachen. Von den 37 Patientinnen mit G3-Tumoren starben 12 (32,4 Prozent), davon 9 am Karzinom (24,3 Prozent). Die verbliebenen 3 Patientinnen starben an anderen Ursachen.

In Bezug auf das Gesamtüberleben zeigte das Grading keine statistisch signifikanten Abhängigkeiten.

Es fiel jedoch auf, dass bei den Patientinnen mit undifferenzierten Karzinomen (G3) das Überleben minimal verlängert war als das der Patientinnen mit besser differenzierten Karzinomen.

### **3.1.4 Lymphknotenstatus und Gesamtüberleben**

Bei der Untersuchung des Kollektivs bezüglich der prognostischen Auswirkung des Lymphknotenstatus auf das Gesamtüberleben wurde das Kollektiv in zwei Gruppen geteilt, nachdem die Patientinnen ausgesondert worden waren, bei denen der Status unbekannt war. In dem einen Kollektiv befanden sich die Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen und in dem anderen die Patientinnen bei denen keine Lymphknotenmetastasen vorhanden waren.

Von den 39 Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus starben fünf (12,8 Prozent), drei am Tumor (7,7 Prozent) und zwei (5,13 Prozent) an anderen Ursachen. Von den 11 Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus starben drei (27 Prozent) und von diesen alle am Karzinom.

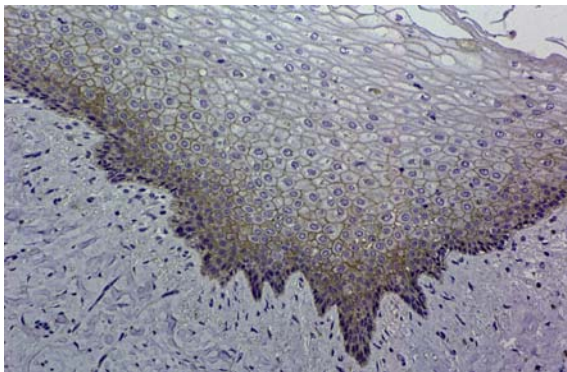
Die Auswirkung des Lymphknotenstatus erreicht bei der Überlebensanalyse keine Signifikanz ( $p=0,0745$ ).

Fernmetastasen hatten fünf der Patientinnen. Diese verstarben alle innerhalb der ersten drei Jahre des Beobachtungszeitraumes am Tumor und hatten demnach eine signifikant schlechtere Prognose ( $p = 0,002$ ). Eine Lymphangiosis carcinomatosa wiesen ebenfalls fünf der Patientinnen auf, von denen drei in den ersten drei Jahren verstarben, die beiden weiteren nach fünf bzw. sieben Jahren. Einen statistisch signifikanten Zusammenhang gab es jedoch nicht.

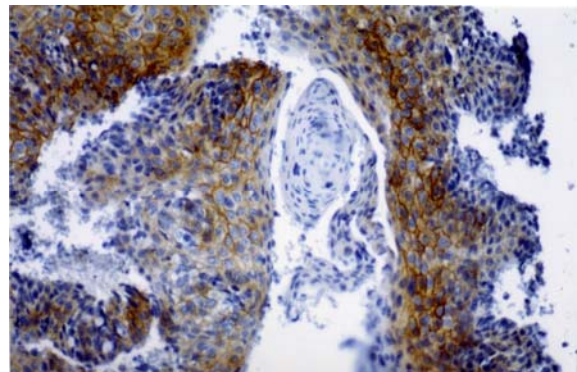
## 3.2 Die Expression der Rezeptoren

### 3.2.1 HER2

Im normalen Plattenepithel ließ sich regelmäßig eine deutliche HER2-Expression, besonders in den basalen Zellen, dem Proliferationskompartiment, nachweisen. Das Färbemuster war überwiegend membranständig, teilweise auch zytosolisch und vor allem aber auffallend heterogen. Die Intensität schwankte nicht nur sehr stark zwischen den unterschiedlichen Präparaten, sondern auch in ein und demselben Tumor, wobei man mitunter sehr stark angefärbte Tumorzellinseln in sonst nicht expressiven Bereichen finden konnte. Deshalb wurde ein mit dem HercepTest-Score bewertetes Präparat erst als positiv beurteilt, wenn mehr als 10 Prozent der Zellen gefärbt waren.



**Abb. 2** unauffälliges Plattenepithel der Zervix: HER2-Expression sichtbar als Membranfärbung vor allem der basalen und suprabasalen Zellschichten.



**Abb. 3** Zervixkarzinom einer 63-jährigen Pat., FIGO 4a, G3, sechs Jahre nach Erstdiagnose ohne Hinweis auf Metastasen: starke HER-2 Expression

Bei den Karzinomen war eine starke HER2-Expression ein eher seltenes Ereignis. Knapp 27 Prozent (21/78) der Fälle zeigten eine mäßige bis starke Färbung. Dies entspricht den Angaben in der Literatur (Hale et al. 1992, Ndubisi et al. 1997).

Score	Häufigkeit (n)	Prozent
0	25	32,1%
1+	32	41,0%
2+	16	20,5%
3+	5	6,4%
Gesamt	78	100,0%

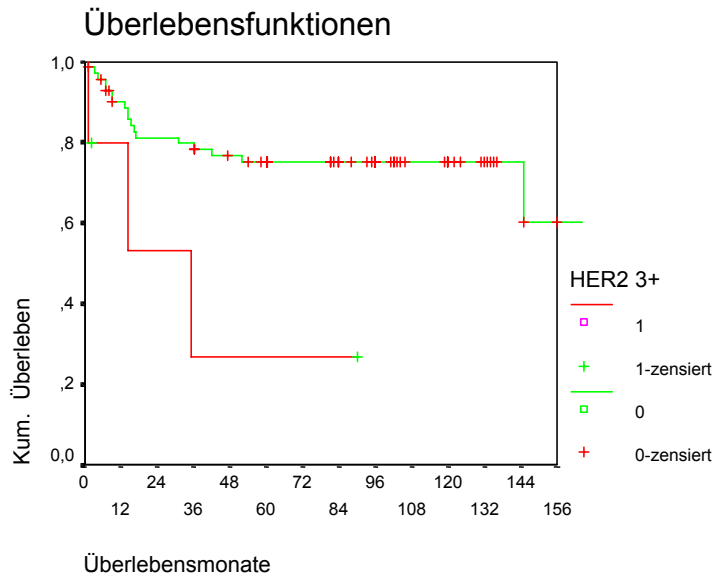
**Tabelle 6: Verteilung der HER2-Expression**

Bei der statistischen Analyse konnten keine Zusammenhänge zwischen einer HER2-Expression und dem FIGO-Stadium, dem Grading, Lymphknotenstatus oder Fernmetastasen gefunden werden.

### **3.2.1.1 Die prognostische Bedeutung von HER2**

Um zu untersuchen, ob die Expression von HER2 möglicherweise mit dem Überleben der Patientinnen korreliert, wurden in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier die Überlebenszeiten der HER2-positiven mit denen der HER2-negativen Patientinnen verglichen. Bewertet wurden zunächst alle Patientinnen mit einer Expressionsstärke 2+ und 3+. Dabei ergab sich kein Zusammenhang der HER2-Expression mit dem Überleben ( $p = 0,14$ ), Tendenziell ist aber eine negative Auswirkung einer HER2-Expression auf das Überleben erkennbar.

Betrachtet man nur die Patientinnen mit einer sehr starken HER2-Expression von 3+, lässt sich eine statistische Signifikanz von  $p=0,0118$  nachweisen.



**Abbildung 4: Abhängigkeit des Überlebens von einer HER2-Überexpression 3+**

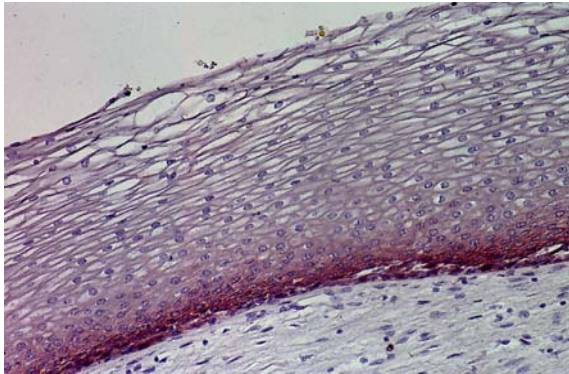
Aufgrund der kleinen Fallzahl von 5 Patientinnen mit einer HER2-Überexpression von 3+ ist eine Aussage bezüglich der Prognosefähigkeit nur eingeschränkt möglich.

### 3.2.2 EGFR

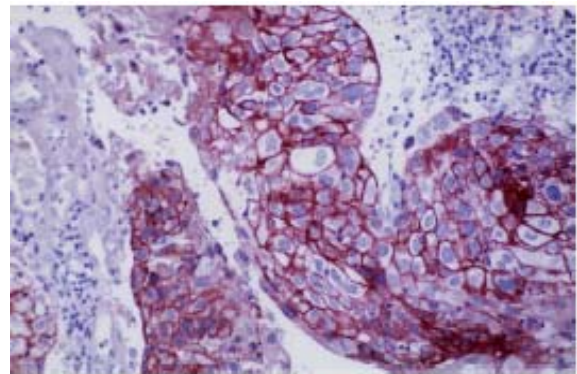
Im unauffälligen Plattenepithel fand sich vor allem in den basalen und parabasalen Schichten eine kräftige EGFR-Färbung, die in den oberen, weiter differenzierten Schichten abnahm, bzw. ganz verschwand. Dieser Befund entspricht den Beschreibungen in der Literatur (Goepfing et al. 1989, Berchuck et al. 1990).

Als interne Kontrolle diente immer die Expression im unauffälligen Plattenepithel. Die Färbungen zeigten sich überwiegend membranständig mit einer schwachen bis mäßigen zytoplasmatischen Färbung.

In allen Präparaten fand sich nach Auswertung zumindest eine schwache Färbung. Insgesamt war das Färbemuster sehr homogen, zumeist waren ca. 90% der Zellen gleichmäßig angefärbt.



**Abb. 5** unauffälliges Plattenepithel der Zervix: Membranfärbung von EGFR vor allem der basalen Zellen (Proliferationszone).



**Abb. 6** Zervixkarzinom einer 81-jährigen Pat., FIGO 3b, G2, 3 Monate nach Erstdiagnose am Tumor verstorben: starke EGFR-Expression

Daraus ergab sich eine Unterteilung in drei große Gruppen mit einem Score von 0-4 (schwach gefärbt), 5-8 (mäßig gefärbt) und 9-12 (stark gefärbt).

Score	Häufigkeit (n)	Prozent
0-4	29	37,18%
5-8	43	55,12%
9-12	6	7,70%
Gesamt	78	100%

**Tabelle 7: Verteilung der EGFR-Expression**

Eine mäßig bis starke EGFR-Färbung fanden wir demnach in ca. 63 Prozent der Fälle (49/78), welches den Angaben in der Literatur entspricht (Berchuck et al. 1990, Hale et al. 1992 und 1993).

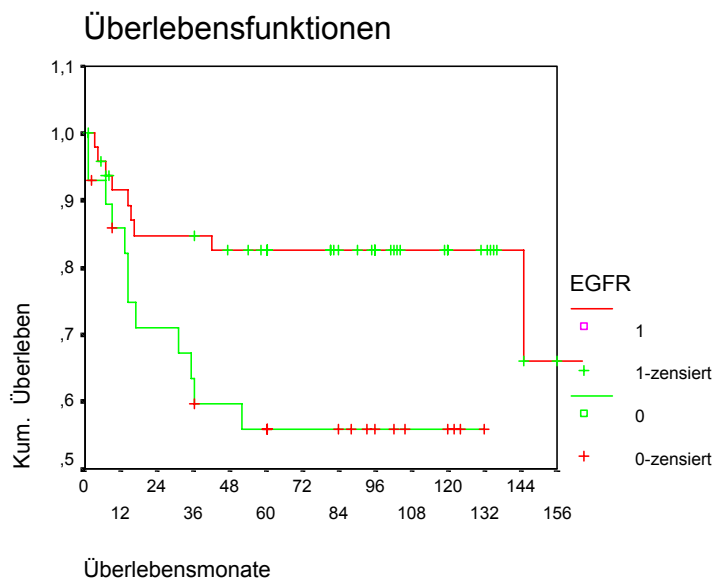
Bei der Korrelation der EGFR-Expression mit dem FIGO-Stadium, dem Grading und dem Lymphknotenstatus ergaben sich keine statistischen Zusammenhänge.



Alle fünf Präparate der Patientinnen mit einer Lymphangiosis carcinomatosa zeigten keine EGFR-Expression. Die statistische Analyse ergab im Chi-Quadrat-Test eine Signifikanz von  $p=0,003$ ; im Exakten Test nach Fisher war  $p=0,006$ .

### 3.2.2.1 Die prognostische Bedeutung von EGFR

Um zu untersuchen, ob die Expression von EGFR einen Bezug zum Überleben der Patientinnen hat, wurden in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier die Überlebenszeiten der EGFR-expressiven mit denen der EGFR-nichtexpressiven Patientinnen verglichen.



**Abbildung 7: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit vom EGFR-Status**

In der Abbildung wird deutlich, dass eine EGFR-Expression signifikant mit einer besseren Prognose verbunden ist ( $p=0,016$ ). Dieser Zusammenhang ist in der Literatur so bislang nicht beschrieben worden. Bereits innerhalb der ersten 5 Jahre waren 12 der 29 EGFR-nichtexpressiven Patientinnen (41,37 Prozent) am Tumor verstorben, die mittlere Überlebenszeit betrug 82 Monate. Von den 49 EGFR-expressiven Patientinnen waren dagegen nur 8 (16,3 Prozent) in den ersten 5 Jahren verstorben. Hier betrug die mittlere Überlebenszeit 145 Monate.

**Status \* EGFR Kreuztabelle**

			EGFR		Gesamt
			0	1	
Status lebend oder andere Todesursachen	Anzahl		17	40	57
	Erwartete Anzahl		21,2	35,8	57,0
	% von		29,8%	70,2%	100,0%
am Tumor verstorben	Anzahl		12	9	21
	Erwartete Anzahl		7,8	13,2	21,0
	% von		57,1%	42,9%	100,0%
Gesamt	Anzahl		29	49	78
	Erwartete Anzahl		29,0	49,0	78,0
	% von		37,2%	62,8%	100,0%

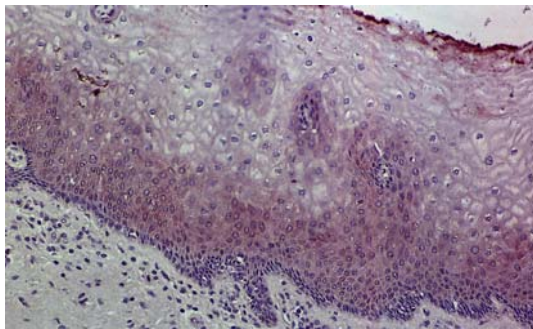
**Tabelle 8: Korrelation der Todesursache mit einer EGFR-Expression**

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer fehlenden EGFR-Expression und einer ungünstigen Prognose (Chi-Quadrat:  $p=0,027$ , Fisher:  $p=0,036$ ). Bei der Betrachtung des Patientinnenkollektivs fiel auf, dass Patientinnen, die an ihrem Tumorleiden verstorben waren und deren Tumore eine fehlende bis schwache EGFR-Expression zeigten, unabhängig von anderen klinischen Parametern, rasante Krankheitsverläufe aufwiesen. So betrug die mittlere Überlebenszeit dieser 12 Patientinnen nur 18 Monate. Im Gegensatz dazu war die mittlere Überlebenszeit der neun Patientinnen, deren Tumore eine hohe EGFR-Expression zeigten und welche am Tumor verstarben 30 Monate.

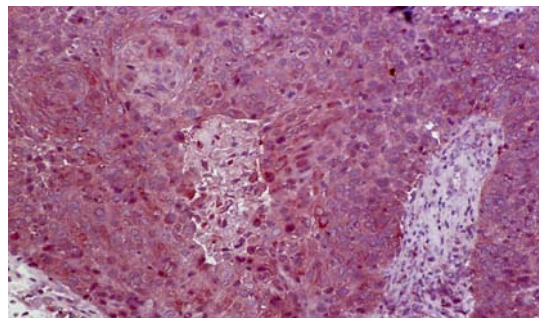
### 3.2.3 HER3

Im normalen Plattenepithel der Zervix zeigte sich regelmäßig eine mäßige HER3-Färbung, wobei diese die basale Zellschicht meist aussparte und erst im parabasalen Kompartiment auftrat. Diese Zellen haben bereits das Differenzierungskompartiment erreicht, können aber jederzeit in das proliferative Stadium wechseln. Die HER3-Färbung ist als eine insgesamt sehr schwache Färbung mit hauptsächlich zytosolischer Lokalisation beschrieben worden (Prigent et al. 1992, Lemoine et al. 1992, Quinn et al. 1995, Rajkumar et al. 1995). Auch die von uns durchgeführten HER3-Färbungen ergaben im Vergleich zu anderen Färbungen ein schwaches Färbesignal.

In den Tumoren zeigt sich in den meisten Fällen eine schwache bis moderate homogene zytosolische HER3-Färbung. In 23 Prozent der Fälle zeigte sich auch eine Kernfärbung, welche aber im Vergleich zu der von HER4 sehr gering war. In etwa der Hälfte der Tumore war eine Membranfärbung nachweisbar. Diese hauptsächlich zytosolische Färbung mit einer vergleichsweise geringen Membranfärbung wurde auch in anderen Publikationen beschrieben (Rajkumar et al. 1995).



**Abb. 8** unauffälliges Zervixepithel: HER3-negative Basalzellen, mäßige zytoplasmatische HER3-Färbung in den suprabasalen Zellschichten.



**Abb. 9** Zervixkarzinom einer 91-jährigen Patientin, FIGO 3b, G3, 5 Jahre nach der Erstdiagnose am Tumor verstorben: starke zytoplasmatische HER3-Färbung

Eine starke HER3-Expression ( $\geq 6$ ) ist ein eher seltenes Ereignis, nur 18 Prozent der Karzinome zeigten eine starke Färbung. Auch diese Zahlen stimmen mit den Angaben in der Literatur überein (Rajkumar et al. 1995, Hunt et al. 1995). Es konnte in allen Präparaten zumindest eine schwache Färbung gefunden werden, als positiv gewertet wurden 74,4 Prozent der Präparate (58/78).

Score	Häufigkeit (n)	Prozent
0-2	20	25,6%
3-5	44	56,4%
6-12	14	18,0%
Gesamt	78	100,0%

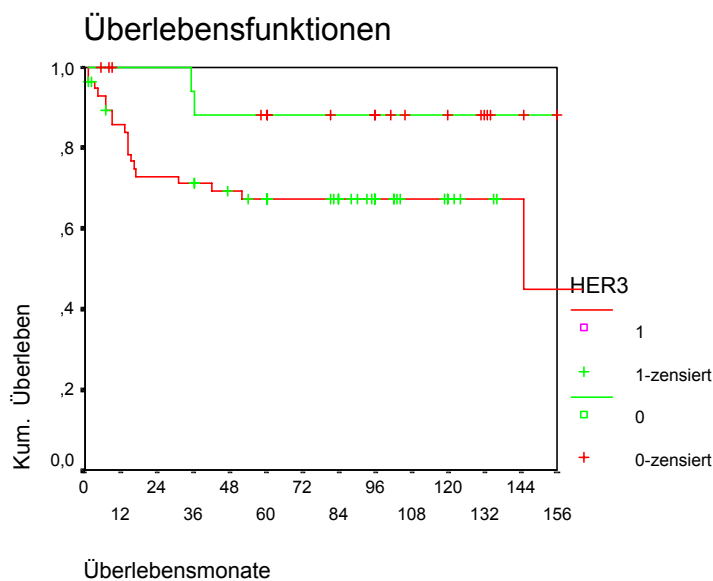
**Tabelle 9: Verteilung der HER3-Expression**

Auch bei der Korrelation der HER3-Expression mit den klinischen Parametern konnte kein Zusammenhang mit dem FIGO-Stadium, dem Grading oder dem Lymphknotenstatus aufgezeigt werden.

### 3.2.3.1 Die prognostische Bedeutung von HER3

Bei der Korrelation einer HER3-Expression mit einer schlechteren Prognose ergab sich im Chi-Quadrat-Test ein signifikanter Zusammenhang von  $p=0,048$  der aber im Exakten Test nach Fisher nicht bestätigt werden konnte ( $p=0,077$ ).

Bei der Gesamtauswertung war die Überlebenszeit der Patientinnen mit einem HER3-exprimierenden Tumor kürzer, die Signifikanz wird jedoch knapp verfehlt ( $p=0,0542$ ).



**Abbildung 10: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit vom HER3-Status**

Kernfärbungen und Membranfärbung waren beim Nachweis von HER3 insgesamt selten. Wir werteten diese getrennt aus, um herauszufinden, ob sich solche Patientinnen bezüglich der Prognose von den anderen unterscheiden. Es konnte jedoch kein Einfluss einer Kern- oder Membranfärbung auf die Prognose festgestellt werden.

Aufgrund der hauptsächlich zytoplasmatischen Färbungen, wurde eine weitere Analyse mit alleiniger Berücksichtigung dieses Parameters durchgeführt.

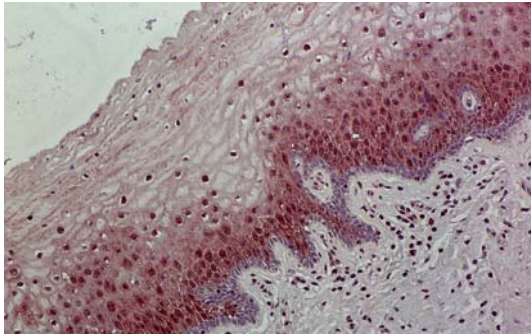
Wurde nur die Intensität der zytoplasmatischen Färbung und die Prozentzahl der angefärbten Zellen berücksichtigt, ergaben sich wie gehabt bei der statistischen Auswertung keinerlei Signifikanzen. Es konnte weder eine Korrelation mit dem FIGO-Stadium noch dem Lymphknotenstatus, dem Alter der Patientinnen, dem Überleben oder der Therapie aufgezeigt werden.

#### **3.2.4 HER4**

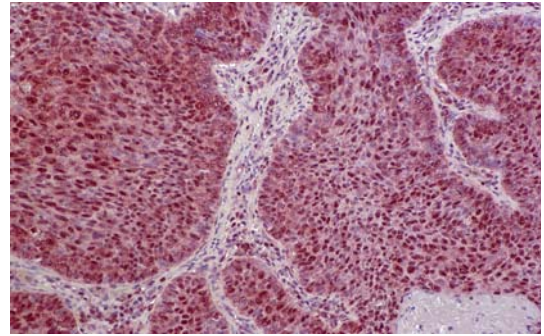
Im normalen Plattenepithel fand sich eine HER4-Färbung ebenso wie bei HER3 erst im parabasalen Kompartiment. Die Färbungen waren meist zytoplasmatisch und gleichzeitig zeigten sich regelmäßig auch relativ starke Kernfärbungen. Insgesamt war die Färbereaktion sehr heterogen mit dicht nebeneinander liegenden expressiven und nicht expressiven Kernen. Ähnlich heterogen erschien das Färbemuster im Tumor. Während das Zytoplasma aller Tumorzellen meist homogen gefärbt war, unterschieden sich im selben Präparat die Kernfärbungen. So wurden traubenförmige Tumorzellverbände mit deutlicher Kernfärbung inmitten eines sonst rein zytoplasmatisch gefärbten Tumors beobachtet.

In 70 Prozent der Tumore waren mehr als 50 Prozent der Kerne positiv gefärbt. Diese eigentlich nicht zu erwartende Kernfärbung wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Srinivasan et al. 1998 und 2000). Membranfärbung wurde bei 30 Prozent der Tumore gesehen.

Eine HER4-Färbung zeigte sich in allen Präparaten, wenn auch teilweise nur schwach. Eine starke Färbung ab einem Score von 8 konnte in 41 der Tumore (52,5 Prozent) gefunden werden. Als positiv wurden 62 der Präparate (79,5 Prozent) gewertet.



**Abb. 11** unauffälliges Zervixepithel: HER4-negative Basalzellen, sowohl mäßige zytoplasmatische Färbung der suprabasalen Zellschicht als auch mäßig starke Kernfärbung.



**Abb. 12** Zervixkarzinom einer 73-jährigen Patientin, FIGO 3b, G3, 11 Jahre nach Erstdiagnose an anderen Ursachen verstorben: mäßige bis starke zytoplasmatische HER4-Färbung, starke Kernfärbung

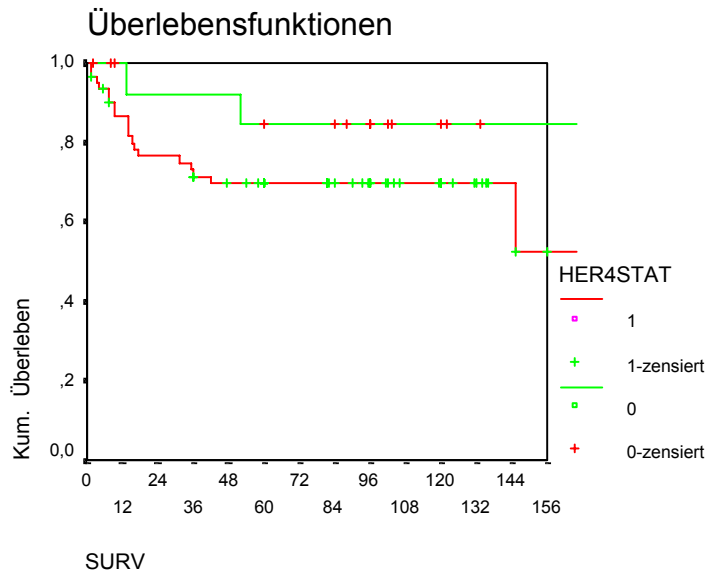
Score	Häufigkeit (n)	Prozent
0-5	16	20,5%
6-7	21	26,9%
8-12	41	79,5%
Gesamt	78	100,0%

**Tabelle 10: Verteilung der HER4-Expression**

Bei der Korrelation des HER4-Status mit dem FIGO-Stadium, dem Grading und dem Lymphknotenstatus konnten keine statistischen Zusammenhänge gefunden werden.

### 3.2.4.1 Die prognostische Bedeutung von HER4

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang einer HER4-Expression mit dem Überleben, eine Tendenz zu einer negativen Auswirkung der HER4-Expression auf das Gesamtüberleben ist jedoch tendenziell nachweisbar.



**Abbildung 13: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit vom HER4-Status**

Da einige der Tumore auch Membranfärbungen zeigten, wurde geprüft, ob sich diese Tumore in ihrem Verhalten von denen mit einer ausschließlich zytosolischen Färbung unterscheiden. In der Überlebensanalyse konnte jedoch kein Unterschied bezüglich der Prognose gefunden werden.

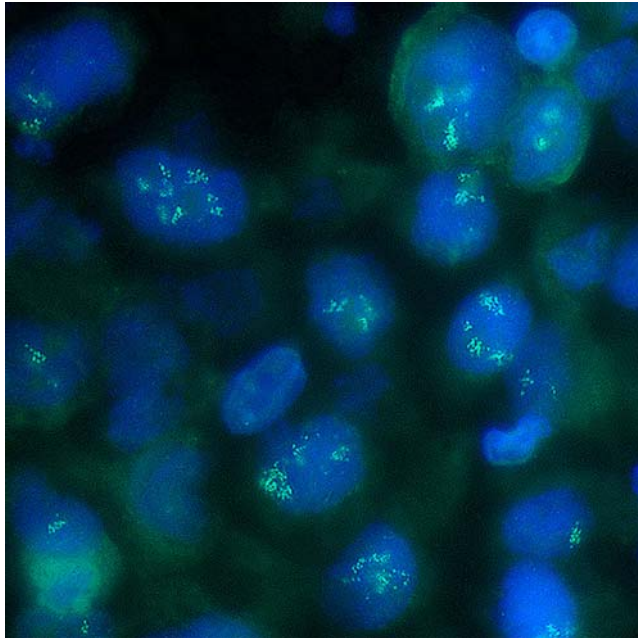
Aufgrund der hauptsächlich vorkommenden Kernfärbung, wurde eine weitere Analyse mit alleiniger Berücksichtigung der Kerne durchgeführt.

Diese andere Aufteilung in HER4-positive und HER4-negative Tumore zeigte jedoch bei der statistischen Auswertung keinerlei Signifikanzen. Weder konnte eine Korrelation mit dem FIGO-Stadium, dem Lymphknotenstatus, dem Alter der Patientinnen, dem Überleben oder dem Verlauf der Therapie aufgezeigt werden. Die Kurven bei der Überlebensanalyse unterschieden sich nur unwesentlich von denen mit Berücksichtigung der Gesamtfärbeintensität.

### 3.2.5 Genamplifikation von HER2

Neben dem Nachweis der Expression des HER2-Rezeptors mittels der Immunhistochemie wurde mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung eine mögliche Genamplifikation des zugehörigen Gens lokalisiert auf Chromosom 17q21 (Popescu et al. 1989) untersucht. Bei

einem Score von  $\leq 4$  wurde das Präparat als nicht amplifiziert angesehen, bei einem Score von  $\geq 5$  wurde das Präparat als amplifiziert bewertet.



**Abb. 14 Zervixkarzinom einer 68-jährigen Patientin, FIGO 3b, G3, starke HER2-Genamplifikation, >20 Kopien, 14 Monate nach Erstdiagnose am Tumor verstorben**

Insgesamt zeigten 16 (20,5 Prozent) von den 78 Tumoren Amplifikationen mit 5 und mehr Kopien. Dies entspricht in etwa den Angaben aus anderen Studien mit 16 Prozent und 37 Prozent (Mitra et al. 1994, Wong et al. 1996, Sharma et al. 1999). Eine starke Amplifikation von über 10 Kopien war jedoch selten (3,8 Prozent).

#### FISH

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig <5	62	79,5	79,5	79,5
5 bis 10	13	16,7	16,7	96,2
10 bis 20	2	2,6	2,6	98,7
>20	1	1,3	1,3	100,0
Gesamt	78	100,0	100,0	

**Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der Amplifikationen**



Es konnte kein Zusammenhang einer Genamplifikation mit dem FIGO-Stadium, dem Grading oder dem Lymphknotenstatus gefunden werden, auch nicht, wenn nur die stark amplifizierten Karzinome (über 10 Kopien bzw. über 20) in Betracht gezogen wurden.

### 3.2.5.1 Die prognostische Bedeutung einer Genamplifikation

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs einer Genamplifikation mit dem Versterben der Patientinnen am Tumor ergab sich ein signifikanter Zusammenhang von  $p=0,003$ , bzw.  $p=0,009$  im Exakten Test nach Fisher.

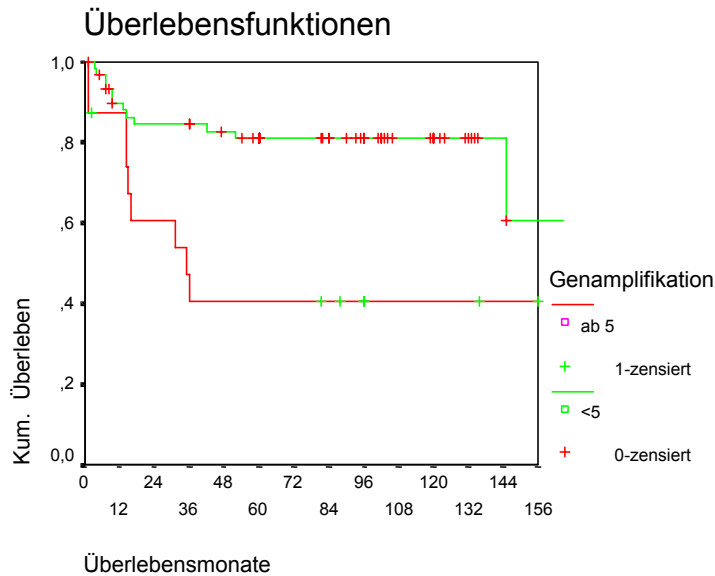
**Status\*Genamplifikation Kreuztabelle**

			Genamplifikation		Gesamt
			<5	ab 5	
Status	lebend oder ander Tumorursachen	Anzahl	50	7	57
		Erwartete Anzahl	45,3	11,7	57,0
		% von TUMORTOD	87,7%	12,3%	100,0%
am Tumor verstorben		Anzahl	12	9	21
		Erwartete Anzahl	16,7	4,3	21,0
		% von TUMORTOD	57,1%	42,9%	100,0%
Gesamt		Anzahl	62	16	78
		Erwartete Anzahl	62,0	16,0	78,0
		% von TUMORTOD	79,5%	20,5%	100,0%

**Tabelle 12: Korrelation der Todesursache mit einer Genamplifikation**

Mit der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier wurden die Überlebenszeiten der Patientinnen mit amplifizierten Tumoren mit denen der Patientinnen mit nicht amplifizierten Tumoren verglichen. Die Unterscheidungsgrenze lag wie oben beschrieben bei  $\geq 5$  Genkopien.

Dabei ergab sich für die Patientinnen mit einer Genamplifikation (5-10, 10-20, bzw.  $>20$ ) ein signifikant schlechteres Überleben als für die Patientinnen ohne Genamplifikation ( $\leq 4$ ) von  $p=0,023$ .



**Abbildung 15: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit von der Genamplifikation**

### 3.3 Koexpression der untersuchten Antigene

#### 3.3.1 EGFR und HER2

Da die Rezeptoren der EGFR-Familie sich untereinander beeinflussen und Heterodimere miteinander bilden, hängt die Reaktion der Zielzelle letztendlich auch von den Verhältnissen der Rezeptoren zueinander ab. Interessant ist, ob die zunehmende Expression des einen Rezeptors eventuell auch mit einer Heraufreglung des anderen Rezeptors einhergeht. So stellt sich die Frage, ob eine Koexpression von zwei Rezeptoren auf das Überleben Einfluss nimmt.

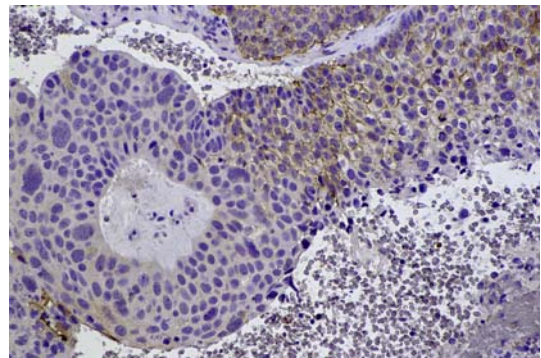
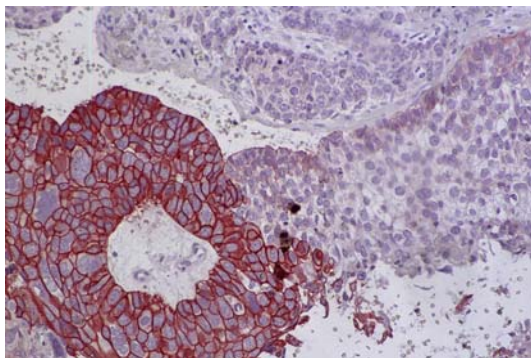
Eine Koexpression von EGFR und HER2 fanden wir in 11 der 78 (14,1 Prozent) der Fälle.

**HER2STAT \* EGFR Kreuztabelle**

			EGFR Status		Gesamt
			0	1	
HER2Status	0	Anzahl	19	38	57
		Erwartete Anzahl	21,2	35,8	57,0
		% von HER2STAT	33,3%	66,7%	100,0%
	1	Anzahl	10	11	21
		Erwartete Anzahl	7,8	13,2	21,0
		% von HER2STAT	47,6%	52,4%	100,0%
Gesamt		Anzahl	29	49	78
		Erwartete Anzahl	29,0	49,0	78,0
		% von HER2STAT	37,2%	62,8%	100,0%

**Tabelle 13: Korrelation einer HER2- und EGFR-Expression**

Tendenziell zeigte sich, dass eine HER2-Expression mit einer Downregulation der EGFR-Expression einher zu gehen scheint. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.



**Abb. 16 und Abb. 17 Tumor einer bei Erstdiagnose 89-jährigen Patientin, FIGO IIa, starke HER2-Expression, insgesamt schwache EGFR-Expression. Deutlich ist hier jedoch eine starke EGFR-Expression- in einem Bereich mit fehlender HER2-Expression. Die Patientin verstarb einen Monat nach Diagnosestellung an ihrem Tumorleiden.**

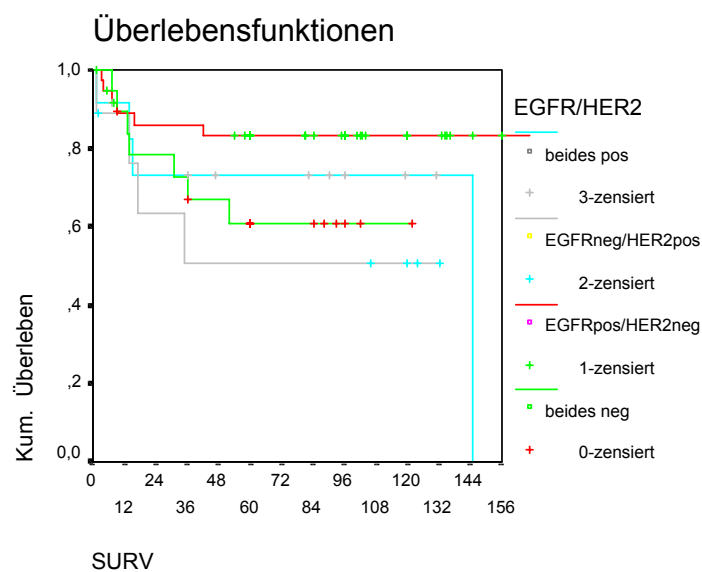
### 3.3.1.1 Koexpression EGFR/HER2 in Bezug auf das Überleben

Untersucht wurde auch der Einfluss einer Koexpression der beiden Rezeptoren in Bezug auf das Überleben.

Von den 11 Patientinnen mit einer Koexpression von HER2/EGFR verstarben 4 (36,4 Prozent) am Tumor, die mittlere Überlebenszeit betrug 27 Monate.

Die Prognose dieser Patientinnen ist in der statistischen Auswertung besser als die derjenigen, welche keinen der beiden Rezeptoren exprimieren und schlechter als die Prognose der Patientinnen, die nur EGFR exprimieren. Dies deutet wiederum auf einen Zusammenhang einer EGFR-Expression mit einer besseren Prognose hin.

Es ergab sich ein signifikant besseres Überleben für die Patientinnen der Gruppe mit einem positiven EGFR-Status und einem negativen HER2-Status im Gegensatz zu den Patientinnen mit einem negativen EGFR-Status und einem positiven HER2-Status ( $p=0,0431$ ).

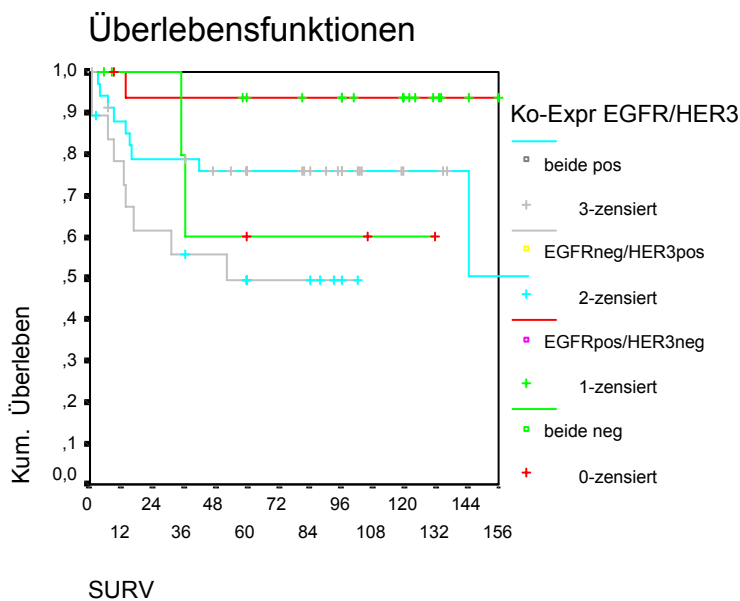


**Abbildung 18: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER2 und EGFR**

### 3.3.2 EGFR und HER3

Eine Koexpression von EGFR und HER3 fanden wir in 45 Prozent der Fälle. Es ergab sich jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang einer Expression von EGFR und HER3.

#### 3.3.2.1 Koexpression EGFR/HER3 in Bezug auf das Überleben



**Abbildung 19: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER3 und EGFR**

Die Kombinationen 1 (EGFR positiv und HER3 negativ) und 2 (EGFR negativ und HER3 positiv) unterscheiden sich hinsichtlich der Überlebenszeit hoch signifikant ( $p=0,0048$ ).

Die Patientinnen mit Tumoren, die beide Rezeptoren exprimieren (Ereignis 3) scheinen im Gegensatz zu denen, die HER3-positiv jedoch gleichzeitig EGFR-negativ (Ereignis 2) sind, eine bessere Prognose zu haben, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ( $p=0,0587$ ). Dass auch die Patientinnen, deren Tumore keinen der beiden Rezeptoren exprimieren eine kürzere Überlebenszeit haben als diejenigen, welche EGFR positiv waren, spricht für eine positive Auswirkung einer EGFR-Expression auf die Prognose der Patientinnen.

Ein ähnliches Ergebnis in Bezug auf das Überleben erhält man bei der alleinigen Auswertung des Zytoplasmas bei HER3.

### 3.3.3 EGFR und HER4

Bei der Analyse der Koexpression von EGFR und HER4 fanden wir eine gleichzeitige Expression beider Rezeptoren in 55,1 Prozent der Fälle.

**EGFR \* HER4 Kreuztabelle**

			HER4STAT		Gesamt
			0	1	
EGFR	0	Anzahl	10	19	29
		Erwartete Anzahl	5,9	23,1	29,0
		% von EGFNEU	34,5%	65,5%	100,0%
	1	Anzahl	6	43	49
		Erwartete Anzahl	10,1	38,9	49,0
		% von EGFNEU	12,2%	87,8%	100,0%
Gesamt	Anzahl	16	62	78	
	Erwartete Anzahl	16,0	62,0	78,0	
	% von EGFNEU	20,5%	79,5%	100,0%	

**Tabelle 14: Korrelation einer HER4- und EGFR-Expression**

In der Gruppe der EGFR-expressiven Tumore ist der Anteil der HER4-Expression signifikant höher als der Anteil der HER4-negativen Karzinome. Nach dem Chi-Quadrat-Test ist dieser Zusammenhang signifikant ( $p=0,019$ ), im Exakten Test nach Fisher war  $p=0,04$ . Eine Koexpression von EGFR und HER4 war schon in einer anderen Studie mit 56 Zervixkarzinomen beschrieben worden (Chang et al. 1999).

Noch stärker signifikant war dieser Zusammenhang bei alleiniger Berücksichtigung der Kernfärbung ( $p=0,010$ ), im Exakten Test nach Fisher war hier  $p=0,013$ .

**EGFR \* HER4 Kerne Kreuztabelle**

			HER4		Gesamt
			0	1	
EGFR	0	Anzahl	14	15	29
		Erwartete Anzahl	8,9	20,1	29,0
		% von EGFNEU	48,3%	51,7%	100,0%
	1	Anzahl	10	39	49
		Erwartete Anzahl	15,1	33,9	49,0
		% von EGFNEU	20,4%	79,6%	100,0%
Gesamt	Anzahl	24	54	78	
	Erwartete Anzahl	24,0	54,0	78,0	
	% von EGFNEU	30,8%	69,2%	100,0%	

**Tabelle 15: Korrelation zwischen einer HER4- und EGFR-Expression**

Eine HER4-Expression scheint also mit einer gleichzeitig einhergehenden EGFR-Expression korreliert zu sein.

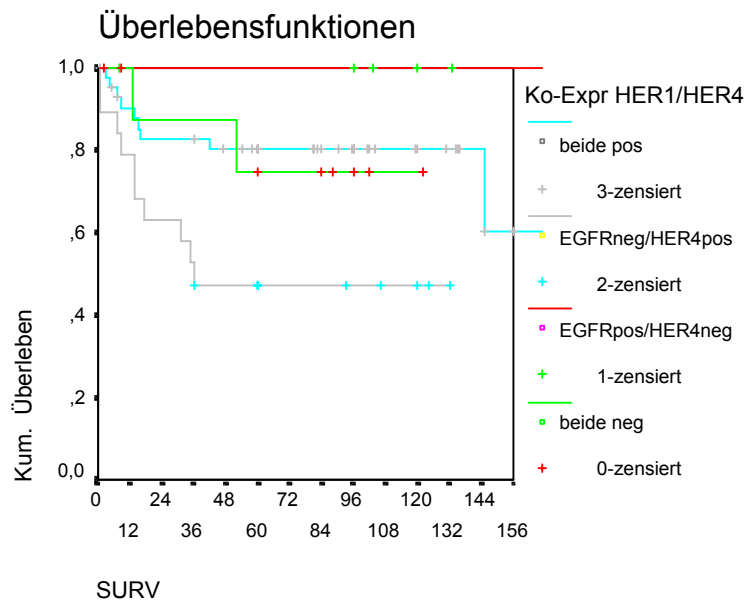
### 3.3.3.1 Koexpression EGFR/HER4 in Bezug auf das Überleben

Untersucht wurde auch der Einfluss einer Koexpression der beiden Rezeptoren in Bezug auf das Überleben der Patientinnen. Hierbei zeigte sich ein deutliches besseres Überleben der Patientinnen mit EGFR-positiven Tumoren als der Patientinnen mit einem HER4-exprimierenden Tumor.

Besonders deutlich in der Grafik wird dieser Zusammenhang bei dem Vergleich der EGFR-positiven und gleichzeitig HER4-negativen Patientinnen (Ereignis 1) mit den EGFR-negativen und gleichzeitig HER4-positiven Patientinnen (Ereignis 2) ( $p=0,0519$ ).

Diese positive Auswirkung einer EGFR-Expression auf die Prognose konnte schon bei einer Koexpression mit HER2 und HER3 aufgezeigt werden.

Eine noch höhere Signifikanz wird erreicht beim Vergleich des Überlebens der Patientinnen, bei denen beide Rezeptoren exprimiert werden (Ereignis 3) mit dem Überleben der Patientinnen, deren Tumore nur HER4 exprimieren und keine EGFR-Expression aufweisen (Ereignis 2) ( $p=0,0091$ ).

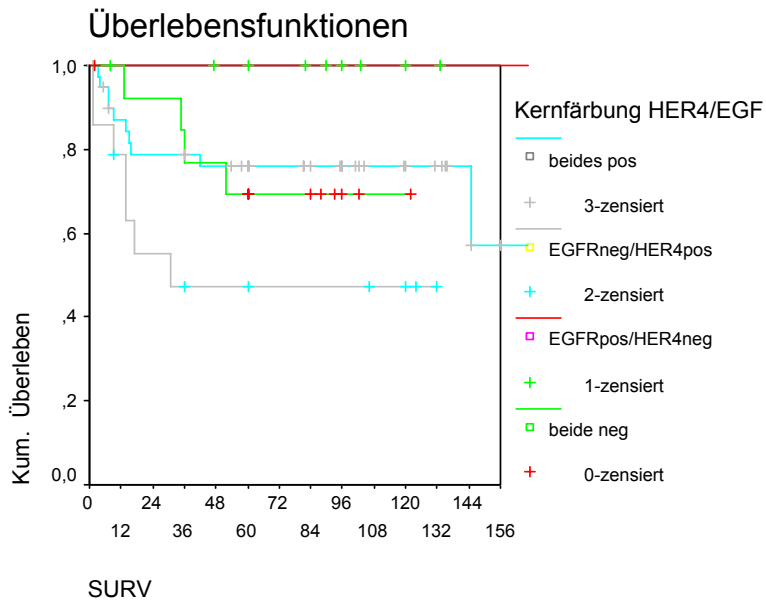


**Abbildung 20: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER4 und EGFR**

Auch bei der Auswertung der Kernfärbungen zeigte sich ein deutlich besseres Überleben der Patientinnen mit EGFR-positiven Tumoren als der Patientinnen mit einem HER4-exprimierenden Tumor.

Hierbei war das Überleben der EGFR-positiven/HER4-negativen Patientinnen (Ereignis 1) höchst signifikant besser als das der EGFR-negativen/HER4-positiven (Ereignis 2) ( $p=0,0108$ ). Ebenfalls signifikant war der Vergleich des Überlebens der Patientinnen der Gruppe 2 mit der Gruppe 3 (Expression beider Rezeptoren) ( $p=0,495$ ), wobei letztere, ebenso wie in der Auswertung davor, länger überlebten.





**Abbildung 21: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER4 (Kernfärbung) und EGFR**

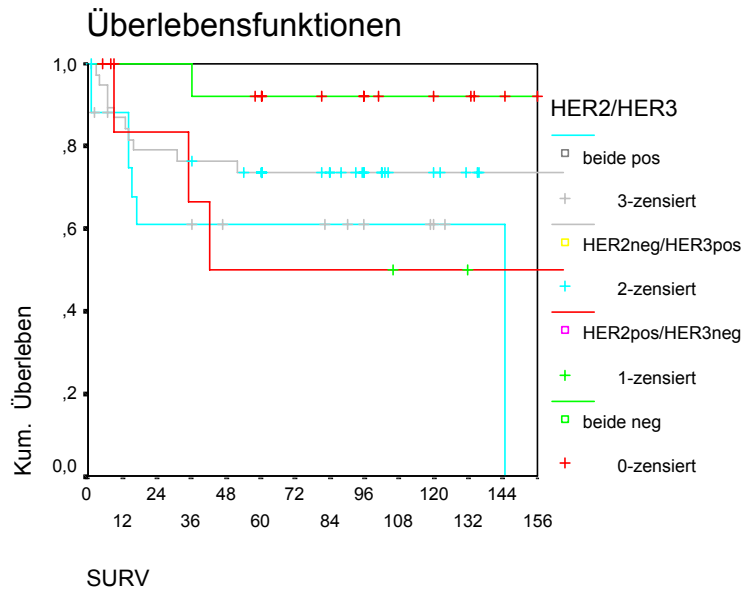
### 3.3.4 HER2 und HER3

Eine HER3-Expression trat im Gegensatz zu einer HER2-Expression sehr viel häufiger auf. Daher kam die Kombination HER3-positiv/HER2-negativ in 41 von 78 Fällen vor (52,6 Prozent), die Kombination HER3-negativ/HER2-positiv dagegen nur in 4 Fällen (5,1 Prozent).

Die statistische Analyse war aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht aussagekräftig.

Es ergab sich in keinem der Fälle eine Signifikanz, genauso wenig wurde bei der alleinigen Berücksichtigung des Zytoplasmas von HER3 eine Signifikanz erreicht.

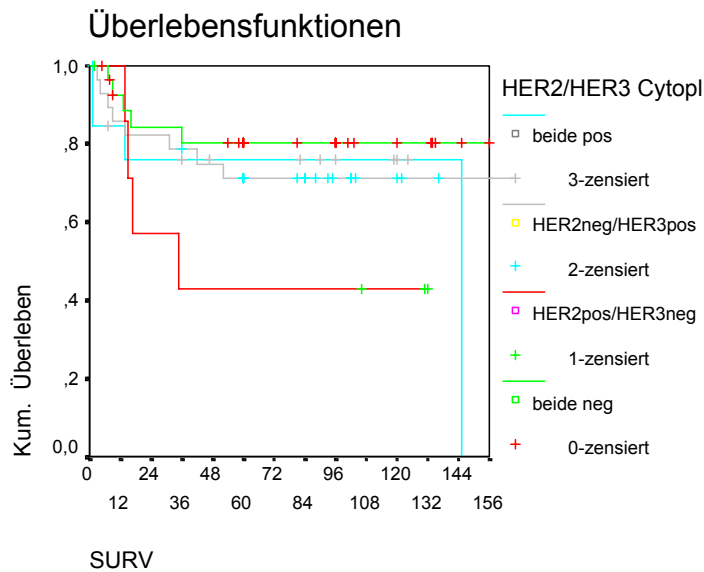
### 3.3.4.1 Koexpression HER2/HER3 in Bezug auf das Überleben



**Abbildung 22: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER2 und HER3**

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Prognose der Patientinnen, deren Tumore beide Rezeptoren exprimierten (Ereignis 3) im Gegensatz zu denen, die keinen der Rezeptoren exprimierten (Ereignis 0) ( $p=0,0162$ ).

Wurde wiederum nur das Zytoplasma von HER3 betrachtet, konnte keine Signifikanz erreicht werden in Bezug auf den Unterschied zwischen der Prognose der Patientinnen, deren Tumore HER2-positiv und HER3-negativ (Ereignis 1) waren im Gegensatz zu denjenigen Patientinnen, bei denen keiner der Rezeptoren im Tumor nachzuweisen waren (Ereignis 0) ( $p=0,0615$ ).



**Abbildung 23: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit der Koexpression von HER2 und HER3 (Zytoplasma)**

Die Koexpression von HER2 und HER3 war ein stärkerer prognostischer Marker als eine HER2-Expression oder auch eine HER3-Expression alleine. Die alleinige HER2-Expression scheint im Vergleich zur alleinigen HER3-Expression eine stärkere prognostische Kraft zu besitzen, vorausgesetzt es wird die zytoplasmatische Färbung von HER3 bewertet.

### 3.3.5 HER3 und HER4

Die Koexpression von HER3 und HER4. Diese war in 47 (60 Prozent) von 78 Fällen nachweisbar. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang, auch nicht bei der alleinigen Betrachtung der Kernfärbung von HER4 und des Zytoplasmas bei HER3.

### **3.3.5.1 Koexpression HER3/HER4 in Bezug auf das Überleben**

Es zeigte sich keine Signifikanz bei der Gesamtauswertung. Die Prognose der Patientinnen, deren Tumore beide Rezeptoren exprimierten, war ungünstiger als bei anderen Kombinationen. Dies gilt sowohl hier als auch bei der Analyse nach Auswertung der Kerne bei HER4 und des Zytoplasmas bei HER3.

### **3.3.6 HER2 und HER4**

Aufgrund des seltenen Vorkommens einer HER2-Expression und des häufigen Vorkommens einer HER4-Expression gab es nur einen Fall mit einer positiven HER2- und negativen HER4-Expression. Daher ist die statistische Analyse nicht repräsentativ. Eine Koexpression lag in 25,6 Prozent der Fälle vor.

Bei der Auswertung von HER4 nach der Kernfärbung ergab sich keine Signifikanz.

#### **3.3.6.1 Koexpression HER2/HER4 in Bezug auf das Überleben**

Es ergaben sich bei beiden Arten der Auswertung keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

### **3.3.7 HER2 und Genamplifikationen**

16 (20,5 Prozent) der 78 Präparate zeigten eine Genamplifikation (s. auch Tabelle 16). Von diesen 16 waren 13 mäßig amplifiziert mit 5-10 Amplifikaten. Von diesen 13 entfielen 9 auf die Gruppe der Präparate, welche eine Expression von HER2 von 1+ aufwiesen und damit als HER2-negativ bewertet wurden. Drei von den mäßig amplifizierten Präparaten zeigten eine HER2-Expression von 2+ und eines eine von 3+. Die stark amplifizierten Präparate mit mehr als 10 Kopien fanden sich ausschließlich in der Gruppe der Präparate mit einer HER2-Expression von 3+. Betrachtet man jedoch diese Gruppe mit Hinblick auf die dort vorkommenden Amplifikationen so ist sie sehr heterogen: Eines der Präparate war bemerkenswerterweise gar nicht amplifiziert, eines wies 5-10 Amplifikate auf, zwei 10-20 und eine weiteres über 20 Amplifikate auf. In der Gruppe der Präparate mit einer HER2-Expression von 2+ waren wiederum nur drei amplifiziert (5-10 Amplifikate), die restlichen

zeigten 4 oder weniger Kopien. Es kann also trotz fehlender Genamplifikation zu einer HER2-Überexpression von 2+ bzw. 3+ kommen.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs der HER2-Expression mit einer Genamplifikation von  $\geq 5$  (16 Präparate) fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Wurden jedoch nur die mit  $>10$  Amplifikaten stark amplifizierte Karzinome (3 Präparate) in Betracht gezogen ergab sich eine statistische Signifikanz (Fisher's Exakter Test  $p=0,017$ ).

Dieser Zusammenhang war auch zu erwarten, da eine übermäßige HER2-Expression meist auf eine Genamplifikation zurückzuführen ist und wiederum eine starke Genamplifikation in den meisten Fällen mit einer übermäßigen HER2-Expression einher geht. Auch hier ist die Aussage jedoch wiederum erschwert aufgrund der niedrigen Fallzahl.

#### HER2 \* FISH

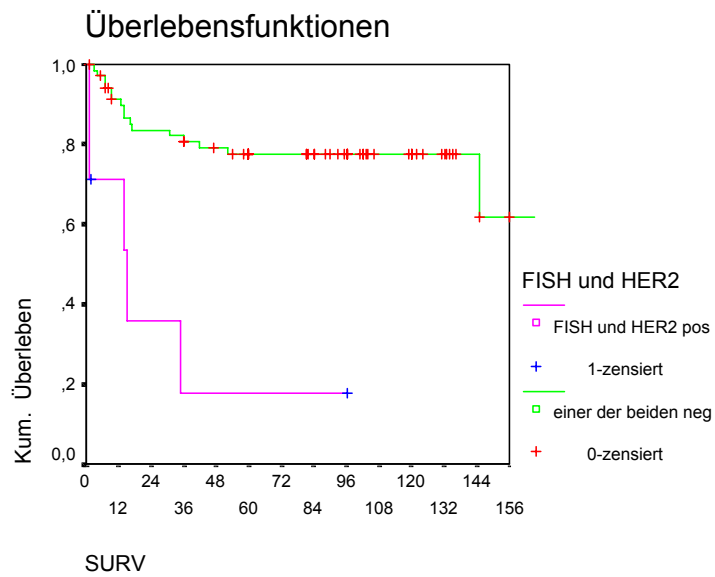
Anzahl		Genamplifikationen				Gesamt
		<4	5-10	11-20	>20	
HER2	0	23	2	0	0	25
	1+	25	7	0	0	32
	2+	13	3	0	0	16
	3+	1	1	2	1	5
Gesamt		62	13	2	1	78

**Tabelle 16: Korrelation einer HER2-Proteinexpression mit einer gleichzeitigen Genamplifikation**

Interessanterweise zeigten die Präparate der Patientinnen mit Fernmetastasen in drei von fünf Fällen eine Amplifikation von 5-10 Kopien, welche nicht von einer HER2-Überexpression begleitet war. Die restlichen zwei Präparate waren nicht amplifiziert.

#### 3.3.7.1 HER2-Überexpression des Rezeptorproteins und gleichzeitige Amplifikation des dazugehörigen Gens in Bezug auf das Überleben

Überprüft wurde das gleichzeitige Vorliegen einer HER2-Proteinüberexpression mit der Amplifikation des dazugehörigen Gens.



**Abbildung 24: Darstellung des Überlebens in Abhängigkeit von einer HER2-Überexpression des Rezeptorproteins und gleichzeitiger Amplifikation des dazugehörigen Gens**

Beide Ereignisse zusammen ergaben die höchste Signifikanz ( $p=0,0000$ ) im Hinblick auf eine wesentlich schlechtere Prognose. Demnach haben die Patientinnen eine schlechtere Prognose, bei denen die starke HER2-Expression auf eine Genamplifikation zurückzuführen ist.