

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Expressionsmuster der gesamten HER-Familie (EGFR, HER2, HER3, HER4) und die Amplifikation des HER2-Gens bei 78 Plattenepithelkarzinomen der Zervix untersucht werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, wie sich die HER-Expression im Rahmen der malignen Transformation verhält und ob bestimmte Expressionsmuster prognostische Bedeutung haben.

Im Gegensatz zum Zervixkarzinom ist die Rolle der erb B-Rezeptorfamilie beim Mammakarzinom Gegenstand diverser Studien. Daher ist bekannt, dass eine Überexpression von HER2 mit besonders aggressiven, undifferenzierten Karzinomen korreliert, deren Prognose entsprechend schlecht ist (Slamon et al. 1987). Bei diesem Patientinnenkollektiv besteht die Möglichkeit der Immuntherapie mit Trastuzumab (*Herceptin™*), einem gegen HER2 gerichteten humanisierten Antikörper, welcher sowohl das rezidivfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben verlängerte (Slamon et al. 2001). Die Immuntherapie bietet den Vorteil, gezielt Tumorzellen zu bekämpfen, ohne die für Chemo- und Radiotherapie typische Toxizität und den damit verbundenen Nebenwirkungen. Diese Tatsachen rücken die erb B-Familie in den Mittelpunkt unseres Interesses in Bezug auf die Untersuchung neuer therapeutischer Möglichkeiten des Plattenepithelkarzinoms der Zervix.

Insgesamt fanden wir bei 21 von 78 Karzinomen eine mäßige bis starke HER2-Expression (Score 2+ bzw. 3+), das sind ca. 27 %. Im normalen Plattenepithel fand sich regelmäßig eine relativ starke HER2-Färbung vor allem in den basalen Zellen wie dies bereits Berchuck et al. 1990 beschrieben hatte. Das Färbemuster beim Karzinom war überwiegend membranständig, teilweise auch zytosolisch und vor allem auffallend heterogen. Daher beurteilt auch der HercepTest-Score das Präparat erst als positiv, wenn mehr als 10 Prozent gefärbt sind. Auch Ndubisi et al. (1997) fanden eine sehr heterogene Färbung, was sie auf eine Tumorerheterogenität oder auch auf in unterschiedlichen Zellzyklen befindliche Zellen zurückführten. Ihr als positiv beurteilter Anteil von 22 Prozent der Tumore (34 von 150 Karzinomen) entspricht auch in etwa unseren Ergebnissen. Etwas höher, bei 38 Prozent liegen die Angaben von Hale et al. (1992), jedoch ist hierbei zu erwähnen, dass beide Studien nicht zwischen den histologischen Subtypen des Zervixkarzinoms unterscheiden.

Nakano et al. (1997) untersuchten wie wir in unserer Studie nur Plattenepithelkarzinome und fanden bei 27 von 64 Tumoren (42,2 Prozent) eine HER2-Überexpression. Pinion et al. (1991) beschrieben sogar eine HER2-Überexpression in über 60 Prozent der Fälle bei einer Gruppe von CIN III und invasiven Karzinomen. Eine der neuesten Studien befand in einem Kollektiv von 82 Zervixkarzinomen aller histologischen Subtypen 24 (29 Prozent) für HER2-positiv, jedoch nur zwei Präparate (2 Prozent) als HER2-überexprimierend mit einer Färbung von mehr als 60 Prozent der Zellen (Rosty et al. 2004). Diese beiden Präparate waren interessanterweise wiederum Adenokarzinome.

In einer Studie mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte eine HER2-Expression bei 18 von 46 (39 Prozent) der Adenokarzinome aber nur bei 4 von 25 (16 Prozent) der Plattenepithelkarzinome beobachtet werden. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,03$) (Han et al. 2002). Bei der Untersuchung von 51 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus konnte keine HER2-Expression gefunden werden (Suo et al. 1995).

Die Unterscheidung der beiden histologischen Subtypen scheint also von enormer Wichtigkeit zu sein und lässt einen direkten Vergleich der Plattenepithelkarzinome der Zervix mit Mammakarzinomen, die in der überwiegenden Mehrzahl Adenokarzinome sind, gar nicht zu.

Bei der Überlebensanalyse ergab sich bei unserer Untersuchung eine signifikant kürzere Überlebenszeit nur für die Patientinnen mit einer HER2-Expression von 3+ ($p = 0,0118$) jedoch sind dies nur 5 Patientinnen (6,4 Prozent), von denen sich 3 im FIGO-Stadium III bzw. IV befanden und nicht mehr operiert wurden. Daher ist diese Aussage eingeschränkt zu bewerten.

Hale et al. (1992) fanden bei 62 Zervixkarzinomen der Stadien Ia und Ib, in deren Gruppe alle histologischen Subtypen vertreten waren, eine starke Korrelation mit einem kürzeren Überleben der Patientinnen. Auch Nakano et al. (1997) konnten dies bestätigen, denn von 64 Patientinnen mit Plattenepithelkarzinomen der Zervix, die postoperativ eine Strahlentherapie erhielten, hatte die Gruppe mit einer HER2-Expression eine signifikant kürzere 5-Jahresüberlebensrate, wobei dieses meist auf nach der Bestrahlung auftretende Lokalrezidive zurückzuführen war. Nakano führte dies auf eine relative Strahlenresistenz der HER2-exprimierenden Karzinome zurück. Einen ähnlichen Trend konnten auch wir bei der Überlebensanalyse der HER2-exprimierenden Patientinnen für die Bestrahlung beobachten, jedoch wurde keine Signifikanz erreicht.

Zu anderen Ergebnissen kamen Ndubisi et al. (1997). Sie konnten keine Korrelation mit der Prognose aufweisen, wobei jedoch in dieser Studie bei der Überlebensanalyse keine Unterscheidung zwischen den histologischen Subtypen getroffen wurde. Es konnte allein dem FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose ein Einfluss auf die Prognose eingeräumt werden. Mandai et al. (1995) konnten eine Korrelation einer HER2-Überexpression mit einer schlechteren Prognose für Adenokarzinome, jedoch nicht für Plattenepithelkarzinome der Zervix, feststellen. Kristensen et al. (1996) untersuchten eine Gruppe von 132 Patientinnen im Stadium Ib und konnten keinen Zusammenhang zwischen einer HER2-Expression und einer schlechteren Prognose beim Plattenepithelkarzinom der Zervix in diesen frühen Stadien nachweisen. Costa et al. (1995) zeigte jedoch an einer Gruppe von Adenokarzinomen bzw. vom gemischten histologischen Typ (adeno-squamös), dass eine HER2-Überexpression erst in den höheren FIGO-Stadien III und IV nachzuweisen war. Dieser Zusammenhang wurde von Nakano et al. (1997) ebenfalls für Plattenepithelkarzinome beschrieben.

Es wird also deutlich, dass die histologischen Subtypen des Zervixkarzinoms in Bezug auf den HER2-Status als Prognosefaktor getrennt betrachtet werden sollten. Zudem scheint das Stadium eine entscheidende Rolle zu spielen, denn auch in unserem Kollektiv befanden sich drei von den fünf Patientinnen mit einer Expression von HER2 im FIGO-Stadium III oder IV. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Ob dies einem aggressiveren Verhalten des Tumors aufgrund der HER2-Expression oder auch einem Selektionsvorteil dieser schneller wachsenden Tumorzellen zuzuschreiben ist oder ob die Tumore in höheren Stadien verstärkt HER2 zu exprimieren beginnen, weil die maligne Transformation den Metabolismus des Rezeptors beeinflusst, ist unklar.

In unserer Studie ist nur eine deutliche HER2-Expression von 3+ mit einer schlechteren Prognose korreliert. Diese Patientinnen wären potentielle Kandidatinnen für eine Therapie mit Trastuzumab. Es ist jedoch zu überlegen wie mit der Gruppe der Patientinnen zu verfahren ist, deren Tumore eine HER2-Expression von 2+ aufweisen. In der Therapie des Mammakarzinoms wird bei diesen Patientinnen weitere Diagnostik betrieben, um herauszufinden, ob die HER2-Überexpression Resultat einer Genamplifikation des HER2-Gens auf Chromosom 17 ist. Falls mehr als 4 Genkopien nachgewiesen werden, kann bei einem Score von 2+ die Indikation zur Herceptintherapie gestellt werden. Verschiedene Studien haben dieses Verfahren bestätigt (Yaziji et al. 2001).

Eine weitere Differenzierung der Tumore scheint daher auch beim Zervixkarzinom sinnvoll. Beim Vergleich diverser Studien zeigt sich zudem dass eine weitere Differenzierung der Karzinome bezüglich des Expressionsmusters von HER2 sinnvoll zu sein scheint, da häufig Schwierigkeiten bei der Objektivierung der Auswertung der Immunhistochemie auftreten. Eventuell kommt es daher zu den erwähnten großen Diskrepanzen bezüglich der prognostischen Bedeutung der Bestimmung des HER2-Status beim Zervixkarzinom. Gründe vermutet die Arbeitsgruppe um Mark et al. (1999) in den kleinen Fallzahlen, dem seltenen Auftreten von Rezidiven beim Zervixkarzinom und auch den technischen Schwierigkeiten, die selbst bei den Versuchen eine Genamplifikation mittels Southern Blot nachzuweisen, auftraten.

Die Wahl der Methode scheint von entscheidender Bedeutung zu sein. Auch Sharma et al. (1999) entdeckten mit der Non Fluoreszenz in situ Hybridisierung bei 18 von 50 Tumoren (36 Prozent) Amplifikate, wohingegen sie mittels Southern Blot nur bei 7 von denselben 50 Karzinomen (14 Prozent) Amplifikationen finden konnten und wiesen dieser Technik damit eine höhere Sensitivität nach. Die Immunhistochemie wiederum wirft Probleme auf durch die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei der Auswertung. Daher schlagen Mark et al. (1999) die Fluoreszenz in situ Hybridisierung aufgrund ihrer höheren Sensitivität und der objektiveren Art der Auswertung als Test für Zervixkarzinome in der Klinik vor, um die Patientinnen mit einer wesentlich schlechteren Prognose zum Zeitpunkt der Operation zu identifizieren.

Unsere Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung zeigten bei 16 der 78 Fälle (20,5 Prozent) eine Amplifikation von >5 Kopien.

Mark et al. (1999) fanden in einer Gruppe von 23 Karzinomen nur zwei amplifizierte Präparate (5-10 Kopien, bzw. 10-20 Kopien), beides waren Adenokarzinome. Auch hier scheint wieder eine Unterscheidung der histologischen Subtypen von Bedeutung zu sein. Eventuell erklärt dies, warum von Mandai et al. (1995) nur für Adenokarzinome der Zusammenhang einer HER2-Überexpression mit einer schlechteren Prognose aufgezeigt werden konnte.

Die Studie von Rosty et al. (2004), welche fünf von 24 HER2-positiven Präparaten von Zervixkarzinomen einer weiteren Diagnostik mittels FISH zuführte, fand keine

Genamplifikation in diesen Tumoren, weder bei Plattenepithel- noch bei Adenokarzinomen der Zervix.

Mit anderen Methoden wie z.B. der PCR wurden von Wong et al. (1996) bei 11 von 70 Plattenepithelkarzinomen (16 Prozent) Amplifikate gefunden, es gab jedoch keine Korrelation einer Amplifikation mit der Überlebenszeit, dem Grading oder dem FIGO-Stadium.

Mitra et al. (1994) fanden mittels Southern Blot bei 7 von den 50 Plattenepithelkarzinomen der Zervix (14 Prozent) Amplifikationen, wobei fünf davon >20 Kopien aufwiesen und die anderen beiden nur fünf Genkopien. Die Tumore waren jeweils mäßig bis gut differenziert.

Unsere Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer Genamplifikation und einer schlechteren Prognose der Patientinnen mit Tumoren, die eine Amplifikation von ≥ 5 Genkopien aufwiesen ($p=0,023$). Dies wird auch noch einmal besonders deutlich in den frühen Stadien FIGO I und II ($p=0,014$). Bei der Korrelation der Genamplifikation mit einem HER2-Score ab 2+ ergab sich keine statistische Signifikanz. Wenn jedoch nur die stark amplifizierten Karzinome in Betracht gezogen wurden (>10), die sich interessanterweise ausschließlich in der Gruppe der Präparate mit einer HER2-Expression von 3+ befanden, wurde eine Korrelation deutlich ($p=0,017$). Dieser Zusammenhang erweckt den Anschein, dass eventuell nur eine starke Amplifikation regelmäßig mit einer HER2-Überexpression einhergeht.

Prognostisch interessierte uns, ob eine gleichzeitige Genamplifikation und HER2-Expression die Überlebenszeit entscheidend beeinflusst, so dass eine Bestimmung beider Parameter eine sinnvolle diagnostische Maßnahme wäre, um diese Patientinnen zu identifizieren. Tatsächlich ergaben unsere Daten eine höchst signifikant kürzere Überlebenszeit der Patientinnen mit einem positiven Befund in der IHC und gleichzeitiger Genamplifikation ($p<0,001$). Es scheint also so, als hätten die Patientinnen, bei denen die HER2-Expression auf einer Genamplifikation beruht, eine signifikant schlechtere Prognose als diejenigen, bei denen andere Ursachen wie zum Beispiel eine gesteigerte Translation oder Transkription zur einer HER2-Überexpression führen.

Zu einer Amplifikation von Onkogenen kommt es meist durch eine genetische Instabilität. Im Falle des HER-2/neu Onkogens führt diese Amplifikation dann zu einer Überexpression des kodierten Proteins in Form des HER2-Rezeptors an der Zellmembran, welches wiederum die

oben beschriebenen Transformationsmechanismen zur Folge haben kann. Diese Amplifikation ist beim Mammakarzinom und beim Ovarialkarzinom in 25-30 Prozent der Fälle die Ursache für eine starke HER2-Überexpression, jedoch gibt es auch Beschreibungen einer HER2-Überexpression ohne gleichzeitig auftretende Genamplifikation; dies ist bei ungefähr 10 Prozent der Mamma- und Ovarialtumore der Fall (Mark et al. 1999, Slamon et al. 1989, Parkes et al. 1990). Bei diesen Tumoren vermutet man eine HER2-Überexpression aufgrund einer gesteigerten Transkription z.B. durch Transkriptionsfaktor AP-2, der bei Brustkarzinom-Zelllinien in der Lage ist, die HER2-Expression zu regulieren (Bosher et al. 1995). Ebenso kann eine gesteigerte Translation die Ursache für eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität sein.

Auch unsere Ergebnisse zeigen in einigen Fällen eine Diskrepanz zwischen einer HER2-Expression und einer Genamplifikation. Bei der Betrachtung der Gruppe der HER2-überexprimierenden Tumore fiel auf, dass das HER2-Gen bei mehreren Präparaten nicht amplifiziert war. Es kann also trotz fehlender Genamplifikation zu einer HER2-Überexpression von 2+ bzw. 3+ kommen.

Neun der sechzehn amplifizierten Präparate (5-10 Amplifikate) zeigten wiederum nur einen Expressionsgrad von 1+ und waren damit HER2-nicht-exprimierend. Diese fehlende HER2-Expression trotz Genamplifikation scheint zunächst unerklärlich. Geht man jedoch davon aus, dass das Gen durch die genetische Instabilität defekt sein kann, ist es möglich, dass ein funktionsloses Protein kodiert wird, welches durch unsere verwendeten Antikörper nicht detektiert werden kann.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs der HER2-Expression mit einer Genamplifikation von ≥ 5 (16 Präparate) fand sich demnach auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Es konnte nur die statistisch signifikante Abhängigkeit einer starken HER2-Überexpression von einer starken Genamplifikation ($p=0,017$) nachgewiesen werden. Auch hier ist die Aussage jedoch wiederum erschwert aufgrund der niedrigen Fallzahl.

Insgesamt lassen sich offensichtlich mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung hinsichtlich der Prognose für Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom der Zervix genauere Angaben machen als mit der Bestimmung des Rezeptorstatus mittels der Immunhistochemie. Obwohl die FISH-Methode zeit- und kostenaufwendiger ist als die Durchführung der Immunhistochemie, scheint sie für den Nachweis einer HER2-Überexpression die sicherste

Methode zu sein. Allerdings wird es nicht möglich sein, sich nur auf eine Bestimmungsmethode zu beschränken, da es sowohl Fälle mit einer HER2-Expression ohne Genamplifikation gibt als auch Fälle, bei denen es trotz Genamplifikation zu keiner HER2-Expression kommt. Für das Zervixkarzinom fehlen Studien mit größeren Fallzahlen.

Mit Hinblick auf die Tatsache, dass HER2 bevorzugter Heterodimerisierungspartner für die anderen EGF-Rezeptoren ist (Karunagaran et al. 1996, Graus-Porta et al. 1997, Klapper et al. 1999) kann der Rezeptor nicht isoliert betrachtet werden. Aufgrund der Interaktionen der verschiedenen Rezeptoren wurden demnach auch die Expressionsmuster der anderen drei epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren analysiert.

Im normalen Plattenepithel fand sich bei den durchgeführten Untersuchungen vor allem in den basalen und parabasalen Schichten eine kräftige EGFR-Färbung, die zu den oberen, weiter differenzierten Schichten hin abnahm bzw. ganz verschwand, was mit den Ergebnissen von Goeppinger et al. (1989) und Berchuck et al. (1990) übereinstimmt. Dies ließ Maruo et al. (1992) eine Rolle des Rezeptors bei der Proliferation des Plattenepithels vermuten, wohingegen er bei der Differenzierung des Epithels offensichtlich an Einfluss verliert, ähnlich wie HER2. Die Färbungen waren überwiegend membranständig mit einer schwachen bis mäßigen zytoplasmatischen Färbung. Dies entspricht der Lokalisation des membranständigen Rezeptors, der im Zuge der Internalisation und des Recycling-Mechanismusses zu bestimmten Zeitpunkten auch im Zytosol nachweisbar ist.

Insgesamt war das Färbemuster sehr homogen, zumeist waren ca. 90 Prozent der Zellen gleichmäßig angefärbt.

Eine starke Expression fanden wir in 55 Prozent der Fälle. Diese Zahlen stimmen in etwa mit denen aus der Literatur überein (Berchuck et al. 1990, Hale et al. 1992 und 1993). Kim et al. (1991) hingegen fanden bei 40 invasiven Zervixkarzinomen beider histologischen Subtypen in 72,5 Prozent eine Überexpression und Kristensen et al. (1996) fanden in nur 28,5 Prozent von 132 Plattenepithelkarzinomen der Zervix eine Überexpression. Diese unterschiedlichen Angaben lassen sich durch die verwendeten Antikörper und unterschiedlichen Bewertungsmethoden erklären.

Da der Rezeptor im normalen Plattenepithel deutlich exprimiert wird, kann im Vergleich zu den invasiven Karzinomen kaum von einer Überexpression des EGF-Rezeptors gesprochen

werden wie dies Ozanne et al. (1986) taten. Es hatte bei unseren Ergebnissen im Gegenteil eher den Anschein, als wäre in den invasiven Karzinomen die Färbung teilweise schwächer, so als würde der Rezeptor im Vergleich zum Normalepithel herunterreguliert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Kimmig et al. (1997) und Pfeiffer et al. (1998) überein, wobei dieses nur für Plattenepithelkarzinome postuliert wurde. Dies lässt vermuten, dass eine Entdifferenzierung der Zellen im Laufe der malignen Transformation zu einer Reduktion von EGFR führen kann. Es gibt Studien, die besagen, dass HPV-immortalisierte Keratinozyten nicht länger eines EGF-Stimulus als Wachstumsreiz bedürfen, was bedeuten würde, dass eine EGFR-Aktivierung in Zervixkarzinomen als Proliferationsreiz nicht mehr essentiell ist und damit eine reduzierte EGFR-Expression erklärt werden könnte (Creek et al. 1995).

Teilweise war das Färbemuster in den invasiven Karzinomen bei unserer Auswertung wie bei Berchuck et al. (1990) homogen über das gesamte Epithel verteilt und nicht wie im gesunden Epithel auf die basalen Schichten beschränkt. Es kam in unseren Präparaten jedoch auch vor, dass in den Tumorzellnestern das gleiche Muster wie im gesunden Epithel gefunden wurde mit einer stärkeren Färbung der basalen Zellen und einer schwächeren Färbung der Zellen in der Mitte der Nester. Dies lässt ein der ursprünglichen Funktion des Epithels naheliegendes Verhalten des Tumors vermuten, was gegen eine starke Entdifferenzierung spricht. Ein ähnliches Färbemuster wurde auch von Kersemakers et al. (1999) beschrieben.

Beim Mammakarzinom ist eine EGFR-Expression sowie eine Koexpression von EGFR und HER2 mit einer schlechten Prognose korreliert (Koenders et al. 1993, Osaki et al. 1992). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden daher unterschiedliche therapeutische Möglichkeiten entwickelt, z.B. E6/E7 antisense mRNA (Hamade et al. 1996), anti-EGFR Antikörper (Rusch et al. 1996) oder Inhibitoren der EGFR-Kinase (Brunton et al. 1994).

Da EGF dosisabhängig über den EGFR das Wachstum von Zervixkarzinomzellen beschleunigt (Steller et al. 1996), wird dem Rezeptor auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Zervixkarzinomen zugeschrieben. Bestätigen konnten dies auch Kimmig et al. (1997), die den wenigen EGFR-überexprimierenden Karzinomen eine erhöhte Aggressivität, welche mit einer schlechteren Prognose einhergeht, zuschrieben. Hale et al. (1993) konnten diesen Zusammenhang jedoch nur für Adenokarzinome aufzeigen. Auch Berchuck et al. (1990) fanden einen Zusammenhang zwischen einer starken EGFR-Expression und einer schlechten Prognose. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass

eine Unterbrechung des EGFR-Signaltransduktionsweges das Karzinomwachstum vermindert (Brunton et al. 1994, Hamade et al. 1996, Rusch et al. 1996). Kristensen et al. (1996) und Kersemakers et al. (1999) beschrieben ebenfalls eine Korrelation zwischen einer EGFR-Expression und einer schlechten Prognose. Kersemakers et al. konnten diesen Zusammenhang vor allem für die Stadien I und II beschreiben. In dieser Studie war jedoch eine EGFR-Expression mit dem histologischen Subtyp des Plattenepithelkarzinoms und eine HER2-Überexpression mit dem adenomatösen Typ korreliert. Dies zeigt wiederum, dass bei der prognostischen Analyse der Rezeptoren im Zervixkarzinom auf eine diesbezügliche Unterscheidung unbedingt geachtet werden sollte.

Überraschenderweise zeigen unsere Ergebnisse jedoch, dass die Patientinnen, deren Tumore eine starke EGFR-Expression aufweisen eine signifikant längere Überlebenszeit ($p = 0,016$) aufwiesen. Unsere Ergebnisse stehen demnach im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Literatur. Da der EGF-Rezeptor jedoch auch in der normalen Wachstumsregulation und Zelldifferenzierung eine Rolle spielt, sind diese Ergebnisse nicht unbedingt widersprüchlich. Der EGF-Rezeptor scheint beim Plattenepithel der Zervix im Hinblick auf die Proliferation eine andere Rolle zu spielen als beim adenomatösen Mammakarzinom. Scambia et al. (1998) fanden z.B. beim Zervixkarzinom keinen Zusammenhang der EGFR-Expression mit dem Überleben. Die 6-Jahresüberlebensrate betrug 45 Prozent für EGFR-nichtexprimierende Patientinnen und 52 Prozent für EGFR-exprimierende Patientinnen, wobei dieses Verhältnis einen ähnlichen Trend wie unsere Daten andeutet. Als Begründung führen Scambia et al. eine Gewebespezifität der EGF/EGFR-Regulierung an, so dass im Zervixkarzinom dem Paar eine andere Rolle zufallen könnte als z.B. im Mammakarzinom. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EGF in vitro Plattenepithelzellen nicht zum Wachstum stimulieren kann (Gill et al. 1981). Eine andere Erklärung findet sich in den Ergebnissen von Filmus et al. (1985) und Kawamoto et al. (1984). Diese beschreiben eine zelluläre Wachstumsinhibition durch einen EGF-Stimulus bei Zellen mit einer starken EGFR-Expression. Dies erklärt, warum ein stark EGFR-exprimierender Tumor langsamer wächst als ein Tumor mit einer schwachen bis mäßigen Expression und so die Ursache für die von uns beobachteten längeren Überlebenszeiten bei einer EGFR-Überexpression sein könnte.

Außerdem wurde eine Abnahme der EGFR-Expression in den höheren FIGO-Stadien (Scambia et al. 1998) beschrieben. Eine ähnliche Tendenz konnte auch bei unseren Daten gesehen werden, jedoch war dieser Zusammenhang nicht signifikant. Dies würde jedoch unsere These unterstützen, dass EGFR-exprimierende Tumore weniger aggressiv wachsen, ganz im Gegensatz zu HER2, welches in den höheren FIGO-Stadien verstärkt exprimiert wird

Unsere Ergebnisse rücken die Behandlung EGFR-exprimierender Tumore in ein völlig anderes Licht. In keinem der bis dato veröffentlichten Artikel konnte diese „protektive“ Wirkung von EGFR bisher aufgezeigt werden. Der Ansatz, den EGF-Rezeptor zu blockieren bzw. auszuschalten - eine beim Mammakarzinom bereits praktizierte Art der Therapie - könnte hier negative Auswirkungen auf das Überleben der Patientinnen haben. An größeren Kollektiven sollten weitere Studien durchgeführt werden. Wichtig ist hierbei vor allem die Unterscheidung der histologischen Subtypen.

Im normalen Plattenepithel der Zervix zeigte sich regelmäßig eine deutliche HER3-Färbung, wobei diese die basale Zellschicht meist aussparte und erst in der parabasalen Schicht auftrat. Dies entspricht den Angaben von Prigent et al. (1992) und Rajkumar et al. (1993), die eine HER3-Expression in normalem Gewebe im Differenzierungskompartiment beschrieben. Das Färbemuster steht damit in genauem Kontrast zu dem von EGFR und HER2. Die HER3-Färbung ist eine insgesamt sehr schwache Färbung und findet sich vorwiegend im Zytoplasma. Dies lässt sich auch in anderen Geweben (Mammakarzinom und Plazenta), welche mit dem gleichen Antikörper inkubiert wurden, nachweisen. Dabei ist nicht klar, ob die schwache Expression von HER3 antikörperbedingt ist oder auf eine nicht funktionierende Tyrosinkinase zurückzuführen ist (Kraus et al. 1989, Hynes et al. 1994, Guy et al. 1994). Auch in den Tumoren zeigte sich in den meisten Fällen eine schwache bis moderate homogene zytoplasmatische HER3-Färbung. In einigen Fällen zeigte sich auch eine Kernfärbung, die aber im Vergleich zur Kernfärbung von HER4 sehr gering war. Eine Membranfärbung wurde von Rajkumar et al. (1995) nicht beobachtet. Dies entspricht auch unseren Befunden.

Unsere Ergebnisse zeigten in 58 von 78 Tumoren eine positive HER3-Färbung (74,4 Prozent). Dies entspricht in etwa den Zahlen in der Literatur jedoch wird dort von einer Überexpression im Plattenepithelkarzinom der Zervix im Vergleich zum normalen Plattenepithel gesprochen

(Rajkumar et al. 1995, Hunt et al. 1995). Unsere Präparate zeigten jedoch nur in 18 % (14/78) eine deutliche Zunahme der Färbeintensität im Vergleich zum normalen Plattenepithel. Diese Diskrepanz der Ergebnisse könnte in der unterschiedlichen Definition einer Überexpression zu finden sein. Eine Überexpression von HER3 wird auch für das endometrioides Adenokarzinom beschrieben (Srinivasan et al. 1999). Ebenfalls korreliert hier eine hohe Differenzierung des Tumors mit einem hohen Level an HER3. Auch Gullick et al. (1996) konnten eine HER3-Überexpression in verschiedenen Tumoren beschreiben.

Beim Mammakarzinom ist eine HER3-Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert. (Witton et al. 2001). Die bisherigen Daten konnten dem HER3-Rezeptorstatus für das Zervixkarzinom jedoch noch keine prognostische Rolle zuschreiben (Rajkumar et al. 1995). Es fehlen größere Studien. Unsere Ergebnisse zeigten eine knapp signifikante ($p=0,05$) kürzere Überlebenszeit für Patientinnen mit einer HER3-Expression.

Im normalen Plattenepithel sparte die HER4-Färbung ebenso wie bei HER3 die basale Zellreihe aus. Sie war auf die oberen zwei Drittel des Epithels beschränkt. Auch Srinivasan et al. (1998) beschrieben eine Zunahme der HER4-Expression in den oberen Zellschichten von Ösophagus, Haut und Zervix und schrieb dem Rezeptor eine Rolle bei der Differenzierung zu. An der normalen Brustdrüse durch Heregulin induziert, konnte diese Differenzierung schon von Jones et al. (1996) beobachtet werden.

Die Färbungen waren meist zytoplasmatisch, gleichzeitig zeigten sich regelmäßig auch starke Kernfärbungen. Membranfärbungen wurden sehr selten gesehen. Insgesamt waren die Färbereaktionen sehr heterogen auch innerhalb ein und desselben Tumors mit dicht nebeneinanderliegenden positiven und negativen Kernen. Ähnlich heterogen erschien das Färbemuster im Tumor. Ein ähnliches Färbemuster fanden auch Srinivasan et al. (1998) in verschiedenen Tumoren und auch in normalen Geweben. Die Ergebnisse ließen sich mit einem anderen Antikörper auch reproduzieren (Srinivasan et al. 2000). Im angrenzenden normalen Brustgewebe konnte diese Arbeitsgruppe zwar Kernfärbungen entdecken, jedoch in sehr viel geringerem Maße als im Tumor, woraufhin sie die Kernfärbung getrennt auswerteten. Sie fanden bei den Mammatumoren, welche in >25 Prozent der Zellen eine Kernfärbung aufwiesen, eine signifikante Korrelation mit einer guten Differenzierung des Tumors, welches ebenfalls für eine Rolle von HER4 bei der Differenzierung sprechen würde, die dem Färbemuster im gesunden Epithel entspricht. Eine Membranfärbung korrelierte mit

keinem der untersuchten Parameter. Die entspricht auch unseren Beobachtungen beim Plattenepithelkarzinom der Zervix.

Die Detektion eines Membranrezeptors im Zellkern konnte auch von anderen Autoren gezeigt werden (Cohen et al. 1998, Kew et al. 2000). Nach Angaben von Cohen et al. (1998) könnte diese Tatsache auf eine unterschiedliche Ligandenaktivierung zurückzuführen sein. HER3 ändert seine Lokalisation nicht, aber HER4 akkumuliert in perinukleären Kompartimenten. (Srinivasan et al. 1998). Möglich wäre auch, dass die zytoplasmatische Domäne in den Kern wandert, sobald die Ektodomäne nach der Proteolyse zur Zelloberfläche zurückgekehrt ist. Auch ein Ligand von HER4, Heregulin-1- β , wird nach der Internalisierung schnell zum Kern bewegt (Li et al. 1996). Der Ligand könnte in diesem Fall als „Transporter“ für den Rezeptor zum Kern dienen oder anders herum. Die genaue Ursache für die Kernfärbung konnte noch nicht hinreichend geklärt werden.

Als HER4-expressiv wurden in unserer Studie insgesamt 62 von 78 Tumoren (79,5 Prozent) bewertet. Eine starke Expression zeigten 41 Tumore (52,6 Prozent). Da das normale Plattenepithel der Zervix ebenfalls eine kräftige HER4-Färbung zeigte, ergab sich hier genau wie bei HER3 das Problem der Definition einer Überexpression. Kew et al. (2000) sprechen z.B. in Bezug auf das Mammakarzinom eher von einer Unterexpression von HER4 in wenig differenziertem Gewebe im Kontrast zu den anderen drei Rezeptoren der EGFR-Familie und einer damit vergesellschafteten besseren Prognose derjenigen Mammakarzinompatientinnen deren Tumore HER4 exprimieren. Sie vergleichen die Funktion von HER4 mit der eines Tumorsuppressorgens. Dies würde diesem Rezeptor, ähnlich dem EGFR, eher eine protektive Rolle im Hinblick auf Proliferationsreize zuweisen. Eine Unterexpression wurde auch von Lyne et al. (1997) für das Prostatakarzinom und von Srinivasan et al. (1998) für weitere zehn Tumorentitäten beschrieben. Allerdings fand diese Arbeitsgruppe ausschließlich in Adenokarzinomen eine Überexpression von 10-20 Prozent, jedoch in keinem der untersuchten Plattenepithelkarzinome.

Andere Autoren fanden wiederum eine Überexpression wie z.B. Gilbertson et al. (1997) in Medulloblastomen bei Kindern oder Haugen et al. (1996) in papillären Schilddrüsenkarzinomen.

Bei der Überlebensanalyse unserer Daten hatte es den Anschein, als würde ebenso wie bei der HER3-Expression das Überleben der HER4-expressiven Patientinnen kürzer sein. Dies war jedoch nicht signifikant.

Kritisch ist jedoch anzumerken, dass der Einfluss einer HER4-Expression auf das Verhalten des Tumors und damit auf die Überlebenszeit der Patientinnen an dem untersuchten kleinen Kollektiv nicht hinreichend geklärt werden konnte. In den anderen Arbeiten zu diesem Thema sind die Aussagen sehr widersprüchlich, diese beziehen sich zudem auf das Mammakarzinom. Für das Zervixkarzinom stehen Analysen des HER4-Rezeptors als prognostischer Parameter noch aus. Unsere Ergebnisse weisen ihm jedoch zunächst keinen prognostischen Wert zu.

Das Zusammenwirken der Rezeptoren kann im Rahmen der Heterodimerisierung synergistisch oder antagonistisch sein. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Untersuchung von verschiedenen Rezeptorkombinationen im Tumor interessant.

Wie bereits erwähnt, spielt hierbei HER2 trotz Fehlen eines direkten Liganden eine entscheidende Rolle. So haben in vitro Versuche gezeigt, dass die EGFR/HER2-Koexpression die zelluläre Transformation beim Mammakarzinom verstärkt (Hynes et al. 1994). Auch geht die Ko-Überexpression beider Rezeptoren mit einer schlechteren Prognose einher als das alleinige Vorkommen eines Rezeptors (Osaki et al. 1992). Dies wird vor allem deutlich bei der Koexpression von HER2 und HER3. HER3 induzierte hierbei alleine keine maligne Transformation. Bei einer Ko-Transfektion der Brustepithelzellen mit HER2 und HER3 jedoch potenzierte es die onkogene Wirkung von HER2: Es kam zu einer stärkeren Transformation als nach alleiniger Transfektion von HER2 (Alimandi et al. 1997). Auch andere Studien konnten zeigen, dass HER3 alleine nicht als Onkogen agiert, aber eine Überexpression dann zur Transformation führt sobald moderate Level von HER2 hinzu kamen (Weiss et al. 1997, Alimandi et al. 1995).

Unsere Daten bestätigen dies. Nur die Koexpression von HER2 und HER3-Expression hat einen signifikanten ($p=0,0162$) Einfluss auf eine schlechtere Prognose.

Dabei ist HER3 der bevorzugte Heterodimerisierungspartner für HER2 (Weiss et al. 1997). Die Heterodimerisierung von HER2 und HER3 führt zu einer erhöhten Affinität der entsprechenden Liganden für HER3 (Betacellulin und Neuregulin α und β) (Karunagaran et

al. 1996, Alroy et al. 1997). Des Weiteren kann es zu einer Bindung von EGF oder TNF α an HER3 kommen, was normalerweise nicht möglich ist (Alimandi et al. 1997, Ling-Mei et al. 1998). Außerdem haben Heterodimere eine größere Stabilität als Homodimere. All dies kann zu einer verlängerten Tyrosinkinaseaktivität mit darauffolgender (Auto-) Phosphorylierung zellulärer Proteine und damit zu einer verlängerten biologischen Antwort im Sinne eines Transformationsreizes führen. (Baulida et al. 1996).

Eine Koexpression von HER2 mit HER3 scheint demnach ein stärkerer prognostischer Marker als eine HER2-Expression ($p > 0,05$) oder auch eine HER3-Expression alleine ($p = 0,05$) zu sein.

In einer Studie über die HER4-Überexpression in Medulloblastomen konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression HER4 und HER2 in über 50 Prozent der Fälle auftrat und mit einer schlechteren Prognose verbunden ist als die Expression der einzelnen Rezeptoren (Gilbertson et al. 1997). Diese prognostische Bedeutung einer Koexpression fanden später auch Srinivasan et al. (2000) beim Mammakarzinom. Ebenfalls beim Mammakarzinom fand eine Arbeitsgruppe ein unterschiedliches Verhalten der Rezeptoren je nachdem, ob eine Koexpression vorlag (Cohen et al. 1998). So stieg zum Beispiel die ligandenabhängige Phosphorylierungsrate bei einer Koexpression von HER2 und HER3. Bei der Untersuchung der Transformationsaktivität konnte durch eine Koexpression der Rezeptoren ein Wachstum in Softagar provoziert werden, welches nicht auftrat, wenn nur ein Rezeptor exprimiert wurde. Die genauen Interaktionen der Rezeptoren sowie die klinische Bedeutung der verschiedenen Koexpressionen beim Zervixkarzinom sind größtenteils noch unbekannt.

Die Koexpression von HER2 und HER4 (26 Prozent) führte zu einem kürzeren Überleben. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Diese Tendenz ist also ähnlich wie bei der Kombination von HER2 und HER3.

Die Koexpression von HER3 und HER4 (60 Prozent) war bezüglich des Überlebens nicht signifikant. Tendenziell war die Koexpression von HER3 und HER4 ebenfalls mit einer kürzeren Überlebenszeit verknüpft. Die Koexpression von EGFR und HER2 führt beim Mammakarzinom zu einer schlechteren Prognose als die Überexpression nur eines der beiden Onkoproteine, die Rezeptoren wirken demnach dort synergistisch (Osaki et al. 1992). Eine

solche Koexpression ist aber sehr selten zu beobachten. Zu gänzlich anderen Ergebnissen kamen wir in dieser Studie: Eine Koexpression des EGF-Rezeptors mit HER2 verbesserte die Prognose der Patientinnen eindeutig im Gegensatz zu einer alleinigen HER2-Expression ($p > 0,05$). Jedoch war das Gesamtüberleben nur signifikant besser bei denjenigen Patientinnen, deren Tumore alleine den EGF-Rezeptor exprimierten ($p = 0,04$). Die schon beschriebene „protektive Wirkung“ von EGFR allein setzt sich in der Koexpression demnach ebenfalls durch. Eine Koexpression trat in unserem Kollektiv bei 14,1 Prozent der Tumore auf (11/78).

Exemplarisch konnte an einem Präparat gezeigt werden, dass sich die Expressionsmuster von EGFR und HER2 komplementär verhalten (s. Abbildung 16 und 17), eine Beobachtung, die sich der statistischen Betrachtung entzieht. Diese Down-Regulierung von EGFR, verbunden mit einer schlechteren Prognose, könnte eventuell ein weiterer Grund sein für das kürzere Überleben der HER2-positiven Patientinnen, ganz unabhängig von der alleinigen negativen Auswirkung einer HER2-Expression. (Koenders et al. 1993, Oka et al. 1994).

Auch bei einer Koexpression von HER3 und EGFR (45 Prozent) wird ein antagonistisches Wirken der Rezeptoren deutlich: Die Patientinnen deren Tumore beide Rezeptoren exprimieren, haben eine wesentlich bessere Prognose als diejenigen deren Tumor HER3 alleine exprimiert. Die Signifikanz wird knapp verfehlt ($p = 0,0587$), jedoch beim Vergleich einer alleinigen EGFR- mit der HER3-Expression erreicht ($p = 0,0048$) im Sinne einer besseren Prognose bei EGFR-Expression allein.

Eine Koexpression von HER4 und EGFR (55 Prozent) ist ebenfalls mit einer signifikant besseren Prognose korreliert als eine HER4-Expression alleine ($p = 0,0091$).

Zur Klärung der genauen Interaktion der Rezeptoren sowie der klinischen Bedeutung der verschiedenen Koexpression bedarf es vor allem für das Zervixkarzinom noch weiterer Untersuchungen.

Belegt werden kann durch die vorgelegte Untersuchung, dass in 20 Prozent der Fälle eine HER2-Überexpression beim Plattenepithelkarzinom der Zervix nachweisbar ist. Dabei geht

die Genamplifikation nicht immer mit einer Überexpression des Rezeptors einher. Jede fünfte Patientin käme deshalb grundsätzlich für eine Trastuzumab-Therapie in Betracht.

Die zweite wesentliche Beobachtung ist, dass der EGF-Rezeptor im Zervixkarzinom eine grundsätzlich andere Rolle zu spielen scheint als im Mammakarzinom. Seine Expression wirkt sich hier eher günstig aus, was bei systemischen Therapieansätzen berücksichtigt werden sollte.