

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Prognosefaktoren

Das Mammakarzinom ist in allen industrialisierten Ländern die häufigste bösartige Tumorerkrankung und Krebstodesursache bei Frauen. Die Inzidenz wird von der International Agency for Research on Cancer (IARC) der WHO im Jahr 2002 weltweit auf 68 Neuerkrankungen je 100.000 Frauen geschätzt (Weltstandard<sup>a</sup>),<sup>35</sup> für Deutschland auf 80 je 100.000. Nach Schätzungen des Gemeinsamen Krebsregisters<sup>158</sup> erkrankten in Berlin im Jahr 2001 etwa 1907 Frauen am Mammakarzinom.

Die Hauptrisikofaktoren sind die genetische Prädisposition (Breast Cancer Gene 1 und 2), das zunehmende Alter, bestimmte gutartige Brusterkrankungen (atypische Hyperplasie, Mastopathie 3. Grades) sowie der Einfluss von Steroidhormonen (frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität, Hormonersatztherapie). Erst kürzlich wurde die weltweit größte Studie zur Hormonersatztherapie in der Postmenopause abgebrochen, nachdem eine erhöhte Inzidenz von Mammakarzinomen im Vergleich zur Placeboeinnahme beobachtet wurde.<sup>36,138</sup>

Die Bestimmung von Prognosefaktoren hat einen prädiktiven wie auch therapierelevanten Aspekt. Man unterscheidet zwischen Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz hinsichtlich Einfluss auf das rezidivfreie und gesamte Überleben der Patientinnen und potentiellen neuen Prognosefaktoren, die bisher noch nicht mit gleicher Evidenz belegt sind. Erstere sind der TNM-Status (Tumorgroße, axillärer Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung), die Tumormorphologie (Grading, histologischer Typ, Proliferationsgrad) und die Expression von Steroidhormonrezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptoren). Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus der stärkste Prognosefaktor. So korreliert die Anzahl der

---

<sup>a</sup> Die absoluten und relativen Häufigkeiten sind bei unterschiedlicher Bevölkerungszahl und -struktur der einzelnen Länder nicht vergleichbar. Die altersspezifischen Raten werden daher in altersstandardisierte Raten umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Diese standardisierten Raten beziehen sich auf 100.000 Personen einer in Bezug auf die Besetzung der einzelnen Altersklassen fiktiven Bevölkerung, wie standardisierte Weltbevölkerung für den Weltstandard.

befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko des Rezidivs und des Todes sowie mit der Tumorgröße. Um neue Prognosefaktoren in der Routinediagnostik zu etablieren, bedarf es zweier Voraussetzungen: (I) einer statistisch einwandfreien und in unabhängigen Studien belegten Relevanz und (II) aus der Diagnostik ableitbarer klinischer Konsequenzen. Diese sind für den HER2/*neu*-Status mit der Möglichkeit einer Herceptin<sup>®</sup>-Therapie gegeben.

### 1.1.2 Rolle des Östrogenrezeptors

Östrogene haben auf gesundes und präinvasives Brustdrüsenepithel einen wachstumsfördernden Effekt. Die Tatsache, dass Östrogenrezeptor (ER) -positive, nicht proliferierende Zellen und ER-negative, aber aktiv proliferierende Zellen nebeneinander existieren, führte zu der Annahme, dass in der gesunden Brust das Größenwachstum durch Östrogene wahrscheinlich indirekt über weitere Faktoren (z. B. Wachstumsfaktoren) vermittelt wird. Clarke et al.<sup>17</sup> nahmen einen parakrinen Sekretionsmechanismus der ER-positiven Zellen auf Stammzellen mit Proliferationspotential an.

Die beiden Isoformen des Östrogenrezeptors (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) gehören zu den nukleären Steroidhormonrezeptoren, die als ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren agieren. Östrogene vermitteln ihre zellulären Effekte durch Bindung an den cytoplasmatischen ER $\alpha$ , die zu einer aktivierenden Konformationsänderung des Rezeptors führt. Als deren mittelbare Folge wird die Expression spezifischer Gene über zellkerngebundene Mechanismen stimuliert. Der Ligand-Rezeptor-Komplex wird zum Kern transportiert<sup>176</sup> und bindet mit hoher Affinität an eine als *estrogen response element* (ERE) bezeichnete DNA-Sequenz im Promotor des Zielgens. ER $\alpha$  ist an den meisten ERE-Promotoren ein potenterer Transkriptionsaktivator als ER $\beta$ .<sup>22</sup>

In gesundem Brustdrüsenepithel wurde eine geringere ER $\alpha$ -Expression als in maligne transformiertem festgestellt.<sup>133</sup> Auch findet man in der gesunden Brust wenige einzelne ER $\alpha$ -exprimierende Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu ER $\alpha$ -negativen. Erstere nehmen im Alter zahlenmäßig zu, bis sie nach der Menopause ein Plateau erreicht haben. Mikroskopisch bilden sie physiologischerweise unterschiedlich große Zellnester inmitten ER-negativer Zellen. ER $\alpha$  spielt eine Rolle bei der Krebsentstehung und Progression. So besteht eine Korrelation zwischen einer ER $\alpha$ -Überexpression in normalem Brustdrüsengewebe und einem erhöhten Brustkrebsrisiko.<sup>75,89</sup>

Bei postmenopausalen Frauen wurden häufiger ER-positive Mammakarzinome als bei prämenopausalen beobachtet<sup>135</sup> und in frühen Karzinomvorstufen wie der atypischen duktalem Hyperplasie und den *in situ* Karzinomen tatsächlich ER $\alpha$ -positive Zellnester gefunden.<sup>146</sup> 75 % der *in situ* Karzinome exprimieren in der Mehrheit der Zellen hohe ER-Level.<sup>71,116</sup> Khan et al.<sup>75</sup> vertreten die Auffassung, dass durch hohe ER $\alpha$ -Expression Brustdrüsenzellen effektiver auf den Risikofaktor Östrogen ansprechen und einen Selektionsvorteil hinsichtlich des Größenwachstums besitzen. Nach Fuqua et al.<sup>41</sup> werde der Östrogenrezeptor im frühen Stadium der Karzinombildung aus noch nicht geklärten Ursachen hochreguliert oder ein ER $\alpha$ -positiver Zellklon während der Karzinomprogression selektiert.

Demgegenüber ist die ER $\beta$ -Expression in Karzinomen etwas geringer als in normalem Brustdrüsengewebe,<sup>65,96</sup> in präinvasiven Läsionen ist sie sogar signifikant verringert.<sup>136</sup> ER $\beta$  könnte somit eine protektive Rolle bei der Proliferation und Karzinogenese einnehmen, indem er die über den ER $\alpha$  vermittelten proliferationsfördernden Effekte hemmt.<sup>51</sup> Jedoch haben Patientinnen mit ER $\alpha$ -positiven Karzinomen ein längeres metastasenfreies und Gesamtüberleben.<sup>15,79</sup>

### 1.1.3 Fernmetastasierung

Die lymphogene Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt über die axillären, supra- und infraklavikulären, parasternalen und zervikalen Lymphknoten. Die Thoraxwand, die Pleurahöhle und die Lunge können lymphogen oder per continuitatem befallen werden.

Die Tendenz zur hämatogenen Metastasierung ist beim Mammakarzinom sehr hoch. Bevorzugte Organe sind das Skelettsystem, die Haut, die Pleura, die Lungen, die Leber und das Gehirn. Das Skelettsystem stellt in Abhängigkeit von Tumorstadium und Rezeptorstatus den häufigsten Manifestationsort hämatogener Metastasen dar. 20 % der Mammakarzinompatientinnen entwickeln Knochenmetastasen. Es findet sich ein überwiegend osteolytisches Wachstum mit bevorzugter Lokalisation in Becken, Lendenwirbelkörpern, Schädelknochen, Oberschenkelknochen und Rippen.

Liegen Fernmetastasen vor, ist nach heutigem Wissensstand eine Langzeitheilung nur in wenigen Ausnahmefällen zu erreichen. Die Therapiewahl erfolgt krankheitsadaptiert und individualisiert. Ziel einer palliativen Therapie ist die Erhaltung einer möglichst hohen

Lebensqualität und Symptomfreiheit. Für alle Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom sollte eine systemische Therapie gemäß den evidenzbasierten Konsensusempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO)-Organkommission "Mamma"<sup>180</sup> in Betracht gezogen werden.

**Hormontherapie.** Sie ist die Therapie der ersten Wahl für Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Karzinomen und niedrigem Tumorprogressionsrisiko aufgrund einer begrenzten Metastasenzahl mit Beschränkung auf Weichteile und Knochen, des Fehlens einer Metastasierung in lebenswichtige Organe sowie eines langen krankheitsfreien Intervalls (> 2 Jahre). Erster endokriner Behandlungsschritt ist bei postmenopausalen Frauen der Einsatz eines Aromatasehemmers der dritten Generation, bei prämenopausalen Frauen die Ausschaltung der Ovarialfunktion in Kombination mit Tamoxifen. Generell sollte einer Hormontherapie vor Einsatz einer Chemotherapie der Vorzug gegeben werden.

**Chemotherapie.** Primäre Therapieoption für symptomatische Patientinnen mit mittlerem bis hohem Progressionsrisiko: negativer Hormonrezeptorstatus, krankheitsfreies Intervall von weniger als 2 Jahren, rasche Tumorprogression, extensive und/oder viszerale Metastasierung unter Einbeziehung lebenswichtiger Organe. Bei Tumorprogress unter Hormontherapie ist ebenfalls eine zytostatische Therapie indiziert. Der Nachteil einer zytostatischen Therapie ist die hohe Toxizität aufgrund der unspezifischen Abtötung proliferierender Zellen.

**Bisphosphonate.** Im Zentrum der Therapie bei ossärer Metastasierung stehen Bisphosphonate aufgrund ihrer knochenstabilisierenden Wirkung. Indiziert sind sie insbesondere bei Hyperkalzämie, metastasenbedingtem Knochenschmerz, osteolytischen Metastasen und tumortherapieinduzierter manifester Osteoporose. Bei symptomatischen und frakturgefährdeten Knochenmetastasen sind zur Schmerzkontrolle, Mobilitäts- bzw. Funktionsverbesserung, lokalen Stabilisierung sowie zur Minderung der Frakturgefahr zusätzlich lokale Strahlentherapie und operative Therapie effektiv.

**Immuntherapie.** Im Gegensatz zu den zuvor genannten Therapien stellt die Immuntherapie mit tumorantigen-spezifischen monoklonalen Antikörpern eine selektive Therapiegruppe dar. Der HER2-Antikörper *Trastuzumab* ist die derzeit einzige zugelassene Immuntherapie für das HER2-überexprimierende metastasierte Mammakarzinom (siehe auch 1.3.3). Möglich ist die First-line-Therapie in Kombination mit Paclitaxel sowie die Monotherapie nach Vorbehandlung

mit Anthrazyklinen und Taxanen. *Trastuzumab* sollte möglichst frühzeitig eingesetzt und bis zum erneuten Progress der Erkrankung fortgeführt werden.

## 1.2 Die Typ I-Wachstumsfaktorrezeptoren

### 1.2.1 Struktur

Zur Familie der Typ I-Wachstumsfaktorrezeptoren gehören die vier Zelloberflächenrezeptoren HER1 bis 4 (**h**uman **e**pidermal **g**rowth **r**eceptor), die an der Signaltransduktion für Zellwachstum und Differenzierung gesunder Zellen beteiligt sind. Sie werden von den jeweiligen c-erbB-Genen (cellular avian **e**rythroblastosis homolog **B**) kodiert und deshalb auch c-erbB1- bis 4-Rezeptoren genannt.

**Historisches.** Die Evolution von HER-Signaltransduktionswegen ist stark mit der komplexer Organismen vergesellschaftet. Ein HER-ähnlicher Rezeptor ist bereits in den Membranen einfacher Lebensformen zu finden. Während im Wurm *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nur ein HER-Rezeptor und ein bzw. vier Liganden nachgewiesen wurden, existieren bei Säugetieren bereits vier verwandte HER-Wachstumsfaktorrezeptoren, die eine Vielzahl von Liganden binden. Das humane HER2-Gen ist homolog mit dem Rattengen *neu* und wurde ursprünglich in Neuroglioblastomen von Ratten identifiziert (Synonyme c-erbB2/*neu* und *cneu*).<sup>114</sup>

**Struktur.** Die HER-Rezeptorfamilie umfasst den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR oder HER1, HER2/*neu*, HER3 und HER4. Die Rezeptorproteine sind integrale Membranproteine, die aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen und als Tyrosinkinase wirken. Sie haben eine gemeinsame Struktur: eine extrazelluläre ligandenbindende N-terminale Proteindomäne, ein transmembranäres lipophiles Segment und auf der cytoplasmatischen Seite eine C-terminale Proteindomäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Nur HER3 fehlt der katalytische Anteil, so dass er keine Kinaseaktivität besitzt.<sup>55</sup>

**Onkogene** sind DNA-Sequenzen im Genom der Zelle, die die maligne Transformation von Zellen fördern. Sie entstehen durch Veränderung von Protoonkogenen, die eine wichtige Rolle bei der physiologischen Regulation von Proliferation und Differenzierung der Zelle spielen.

Identifiziert wurden Onkogene zunächst als Bestandteile des Genoms onkogener Retroviren (virale Onkogene: *vonc*). Die heute mehr als 50 identifizierten Protoonkogene können aufgrund der Funktion der Produkte, für die sie kodieren, eingeteilt werden in Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, G-Proteine, Nichtrezeptor-Proteinkinasen (wie Tyrosinkinasen, Serin-/Threoninkinasen), nukleäre Transkriptionsfaktoren, virale Onkogene. Prinzipiell können eine Punktmutation, eine Chromosomentranslokation oder eine Überexpression durch Genamplifikation die Veränderung eines Protoonkogens zum Onkogen bewirken. Das *neu*-Onkogen unterscheidet sich z. B. von *HER2/neu* durch eine Punktmutation, durch die im Genprodukt Glutamat durch Valin ersetzt wird. Aber nicht eine einzelne isolierte Mutation, sondern erst das Zusammenwirken verschiedener Onkogene führt in der Regel zur Tumorentstehung.

Tumorsuppressorgene sind Gene, die in ihrer physiologischen Funktion Zellwachstum, -Proliferation und Apoptose durch wachstumshemmende Signale regulieren. Im Falle ihrer Inaktivierung durch Deletion oder Mutation kommt es zu einer nicht gegenregulierten Wachstumsstimulation, wodurch Tumorentstehung und Tumorwachstum begünstigt werden können.

### 1.2.2 Agonismus und Signaltransduktion

Onkogene Dimerbildung. HER-Rezeptoren liegen in der Plasmamembran als Monomere vor. Eine Rezeptoraktivierung erfordert jedoch die Bildung von Homo- (z. B. *HER1/HER1*) oder Heterodimeren (z. B. *HER1/HER2*).<sup>139</sup> Heterodimere weisen eine höhere Stabilität als Monomere auf. *HER2* bildet unter den vier HER-Rezeptoren den bevorzugten Dimer-Partner.<sup>47,174</sup> Während Dimer-Kombinationen ohne *HER2* schwache, kontrollierbare Wachstumssignale für das physiologische Zellwachstum hervorrufen, führen *HER2*-haltige Dimere zu starken Signalantworten, die mit malignem Wachstum verbunden sein können. Diese starke Signalwirkung von *HER2* liegt zum einen an der relativ langsamen Ligandendissoziation und zum anderen an der verzögerten Induktion des Komplexabbaus. Der aktivste Komplex mit der stärksten Mitoserate besteht zwischen *HER3* mit vielen Bindungsstellen, aber ohne Tyrosinkinaseaktivität, und dem ligandenlosen, aber potenten *HER2* (orphan receptor). *HER2/HER3* ist die häufigste Heterodimer-Kombination in Karzinomzellen und scheint für die Tumorentstehung mitverantwortlich zu sein. Eine HER-Überexpression beeinflusst entscheidend

den spezifischen Dimerisierungsprozess. So triggert die onkogene Rezeptormutation etwa durch Verlust der N-terminalen Domäne und Verlust der kontrollierenden c-terminalen Domäne eine ligandenunabhängige Aktivierung der Tyrosinkinase mit spontaner Bildung aktiver Dimere (konstitutive Aktivierung).

**Liganden.** Für die einzelnen HER-Rezeptoren gibt es verschiedene Liganden. Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), transformierender Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ ) und Amphiregulin (AR) binden spezifisch an HER1. Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (HB-EGF), Betacellulin (BTC) und Epiregulin (EPR) binden sowohl an HER1 als auch an HER4. Neuregulin 1 (NRG-1, auch Heregulin oder neu differentiation factor = NDF genannt) und NRG-2 binden an HER3 und HER4, während NRG-3 und NRG-4 nur an HER4 binden. Erstaunlicherweise binden EGF und BTC an HER2 und HER3, wenn sie zusammen exprimiert werden, aber nicht an einen Rezeptor allein. Für HER2 konnte bisher kein endogener Ligand nachgewiesen werden. Die Liganden sind bivalent und haben einen Einfluss auf den Dimerpartner.

**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 verschiedener intrazellulärer Transduktionskaskaden. Die Signalantwort mündet je nach Zelltyp in Zellproliferation, -wachstum und -differenzierung, Adhäsion und Angiogenese oder Inhibition der Apoptose. Z. B. induziert die aktivierte MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) eine Gentranskription.

**Komplex-Abbau.** Ligand-Rezeptor-Komplexe werden in clathrinbeschichtete Vesikel aufgenommen, in "frühen Endosomen" voneinander getrennt und der Rezeptor entweder an die Plasmamembran recycelt oder, zusammen mit den Liganden, über "späte Endosomen" und Lysosomen vollständig abgebaut. In "frühen Endosomen" bestimmen zwei wesentliche Faktoren über das weitere Schicksal der Rezeptor-Komplexe:

- 1) das Adapterprotein c-Cbl (Haupttyrosinphosphorylisationsprodukt von HER, welches als negativer Regulator von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen agiert, einschließlich EGF, platelet-derived growth factor und colony stimulating growth factor) und

- 2) die Stabilität des aktivierten Ligand-Rezeptor-Komplexes in der schwach sauren Endosomenumgebung.

C-Cbl reagiert im "frühen Endosom" mit dem aktivierten Rezeptor, führt zur Polyubiquitination desselben und induziert dadurch den proteosomalen und lysosomalen Rezeptorabbau. Bei Abwesenheit von c-Cbl oder Expression von v-Cbl (der viralen, onkogenen Version), wird der Rezeptorkomplex nicht abgebaut, sondern an die Plasmamembran recycelt. Stabile HER1-Dimere, die stark an c-Cbl binden, werden immer in Lysosomen abgebaut. Anders als HER1, reagiert HER2 nur schwach mit dem Adaptermolekül, HER3 und HER4 überhaupt nicht.<sup>93</sup> Entsprechend dissoziieren HER2-haltige Rezeptorkomplexe schnell, und HER2 wird wieder auf der Zellmembran exprimiert. Interessanterweise wird HER3 trotz inaktiver Kinasedomäne und fehlender Bindungsstelle für c-Cbl kontinuierlich recycelt.

Es wird vermutet, dass der Antikörper *Trastuzumab* zum HER2-Rezeptorabbau führt, indem er das Vorhandensein von c-Cbl fördert. Damit ist der Recyclingprozess unterbrochen und verminderte HER2-Rezeptorkonzentrationen führen zu Dimerbildungen ohne HER2 und schwächen dadurch maligne Zellwachstumssignale.

### 1.2.3 Expression

HER1: Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und sein 170 kD-Rezeptor (EGFR) wurden erstmals 1974 von Cohen entdeckt.<sup>20,167,168</sup> Erst die komplette Klonierung der HER1-cDNA im Jahre 1984 zeigte die Verwandtschaft mit den viralen Onkogenen v-erbB und v-src und brachten ihn in Zusammenhang mit der Karzinogenese.<sup>175</sup>

HER1 wird physiologischerweise in adulten Geweben des Gastrointestinaltraktes (außer Magen und Darm), des Urogenitaltraktes (außer Nierenglomeruli), der Bronchien, der Gefäßepithelien, der Haut, des Reproduktionssystems einschließlich der Brustdrüse (außer Hoden und Ovar) und der Plazenta exprimiert, aber nicht in Zellen des endokrinen Systems (Schilddrüse, Nebenniere und Pancreasinseln) oder des Nervengewebes<sup>25,52</sup>. Der Rezeptor wird in Bronchialkarzinomen,<sup>59</sup> gastrointestinalen Karzinomen (Magen, Colon, Pancreas), Prostata-, Nieren- und Plattenepithelkarzinomen,<sup>141</sup> in Mamma- und Ovarialkarzinomen exprimiert.<sup>49,181</sup>

In Mammakarzinomen ist eine HER1-Überexpression und die Expression einer verkürzten Form von HER1 (EGFR vIII) vorzufinden. Eine Überexpression konnte in minimal 14 % und maximal 91 % nachgewiesen werden.<sup>37,78,95</sup> In über 40 Studien mit über 5200 Patientinnen sind verschiedene Assoziationen gefunden worden. Die bisher wichtigsten sind:

- 1) Es gibt eine negative Korrelation zwischen positivem HER1-Status und Hormonstatus, wobei die HER1-Positivität in hormon-negativen Tumoren etwa doppelt so hoch ist wie in hormon-positiven Tumoren.<sup>1,9,37,48,78,95,100,140,173,182</sup>
- 2) Es besteht eine Assoziation zwischen positivem HER1-Status und schlechter Tumordifferenzierung.<sup>1,48,120,140,182</sup>
- 3) Ein positiver HER1-Status verkürzt das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.<sup>1,21,48,95,140,173,182</sup>

Die HER1-Amplifikation ist selten (0-14 %) und nur in etwa der Hälfte der Fälle mit einer Rezeptorproteinüberexpression vergesellschaftet.<sup>78</sup>

HER2: Das Onkogen wurde 1981 erstmals in Neuroglioblastomen von Ratten gefunden. Das homologe humane Gen liegt auf Chromosom 17 und kodiert den transmembranären 185 kD-Rezeptor.

Der Rezeptor wurde in einer Vielzahl von adulten Geweben, mit Ausnahme hämatopoetischer, nachgewiesen, insbesondere auch in verschiedenen Geweben humaner Foeten (Nervengewebe, entstehender Knochen, Muskel, Haut, Herz, Lunge und intestinales Epithel). HER2 ist an der embryonalen Entwicklung der Herztrabekel beteiligt und spielt eine große Rolle bei der Entwicklung und Regulation normalen Brustdrüsenwachstums. Er ist nicht nur in verschiedenen Geweben physiologischerweise vorzufinden, sondern auch in einigen humanen Malignomen, wie Bronchial-, Mamma-, Ovarial-, Magen-, Colon-, Pancreas- und Prostatakarzinomen.<sup>141,188</sup> Immunhistochemisch dominiert die Membranfärbung, wobei auch das Cytoplasma eine Färbereaktion zeigt.<sup>126</sup> Das onkogene Potential von HER2 wurde durch seine Fähigkeit, normale Fibroblasten zu transformieren, entdeckt.<sup>63</sup> Eine HER2-Überexpression kann in transgenen Mäusen unter Kontrolle des Promotors des *mouse mammary tumor virus* Mammakarzinome induzieren.<sup>54</sup>

20-30 % der invasiven Mammakarzinome zeigen eine HER2-Überexpression. Auch im duktalem Carcinoma in situ (DCIS), insbesondere des Komedotyps, wurde eine Überexpression gefunden, die mit einem höheren Grading, größerer Ausdehnung, negativem Hormonrezeptorstatus, höherer Proliferationsrate und invasiver Komponente des Tumors assoziiert war.<sup>2,90,108</sup> Die HER2-Überexpression in Mammakarzinomzellen hängt mit einer vielfachen Amplifikation (Entstehung von mehr als den 2 normalen Genkopien) des zugehörigen Genabschnittes zusammen.<sup>118,119</sup> Es ist derzeit bekannt, dass:

- 1) überexprimierende Mammakarzinome mit einem aggressiverem Tumorverhalten und einer schlechteren Prognose einhergehen,<sup>1,64,130,137,148,149,171,172</sup>
- 2) Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Mammakarzinom ein verkürztes rezidivfreies und Gesamtüberleben im Vergleich zu Patientinnen mit negativem HER2-Status haben,<sup>77,148</sup>
- 3) die HER2-Überexpression mit einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie korreliert,<sup>53,159,189</sup>
- 4) die HER2-Überexpression mit einer Resistenz gegenüber einer Hormontherapie durch Herunterregulation des Hormonrezeptors korreliert.<sup>1,13,82,111,183</sup>

HER3: Das Gen des 180 kD-Rezeptorproteins wurde erstmals 1989 von Kraus et al.<sup>83</sup> sowie Plowman et al.<sup>124</sup> geklont. Erst 1993 wurde ein sensitiver und spezifischer monoklonaler Antikörper entwickelt.<sup>129</sup>

Der Rezeptor wird physiologischerweise in adulten Geweben der Haut (insbesondere in Keratinozyten und Melanozyten), des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitaltraktes, der Bronchien, des Gehirns, des peripheren Nervensystems und der Plazenta exprimiert, aber nicht in Fibroblasten, Skelettmuskel, lymphoiden und hämatopoetischen Zellen.<sup>50,83</sup> Eine Überexpression wurde in Lungen-, Mamma-, Ovarial-, Zervix-, Magen-, Pancreas-, Blasen-, Prostata-, Plattenepithelkarzinomen,<sup>141</sup> Glioblastomen und Sarkom-Zelllinien beobachtet.<sup>83</sup> In immunhistochemischen Untersuchungen des normalen Brustdrüsengewebes ist eine schwach bis mäßige fein granuläre Cytoplasmafärbung des luminalen Drüsenepithels und der Azini sowie eine schwache Färbung des Myoepithels zu beobachten. In nicht-malignen Brustzelllinien ist ebenfalls eine

schwache Anfärbung und nur wenig mRNA nachgewiesen worden.<sup>92,170</sup> Die Epidermis zeigt eine deutliche Cytoplasmafärbung.

In Mammakarzinomen ist eine HER3-Überexpression in 13-54 % der Fälle beschrieben.<sup>1,33,43,92,109,128,164,170,182</sup> Ein Großteil der Autoren stimmt überein, dass die Cytoplasmafärbung gegenüber einer Membranfärbung überwiegt. Es gibt auch Studien, in denen nur die Membranfärbung als relevant erachtet wurde,<sup>43,182</sup> letztere fanden eine signifikante Assoziation zwischen Cytoplasma- und Membranfärbung. Die höhere Expression von 67 % im Komedotyp des duktales Carcinoma in situ (DCIS) bei bekanntermaßen höherer Proliferationsrate spricht für eine Upregulation von HER3 während der präinvasiven Phase.<sup>109</sup>

Zusammenhänge mit klinischen Parametern, Überlebenszeiten und anderen Wachstumsfaktorrezeptoren sind sehr unterschiedlich und lassen sich nur durch einzelne Studien belegen:

- 1) Es scheint eine Korrelation zu ungünstigen Prognosefaktoren zu geben: Travis et al.<sup>170</sup> fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen HER3-Überexpression und zunehmender Tumorgroße, Lemoine et al.<sup>92</sup> und Abd El-Rehim et al.<sup>1</sup> mit höherem Lymphknotenstatus, Abd El-Rehim et al.<sup>1</sup> und Naidu et al.<sup>109</sup> mit schlecht differenziertem Tumorgrading, negativem Hormonrezeptorstatus, HER1- und Cathepsin D-Koexpression.<sup>109</sup>
- 2) Einen inversen Zusammenhang zwischen Hormonrezeptorstatus und Gesamtüberleben beobachteten Witton et al.<sup>182</sup> im völligen Gegensatz zu Pawlowski et al.<sup>120</sup> und Knowlden et al.<sup>80</sup> In einigen Studien wurde eine Koexpression mit HER2 beschrieben.<sup>1,43,182</sup>

Man geht davon aus, dass eine Überexpression eher durch vermehrte Gentranskription als durch Genamplifikation hervorgerufen wird.<sup>50,83,92</sup>

HER 4: Der 180 kD schwere Rezeptor wurde erstmals 1993 von Plowman et al.<sup>123</sup> geklont.

Er ist in allen fetalen und adulten Geweben, außer in Nierenglomeruli und peripheren Nerven nachweisbar. Interessanterweise zeigten fetale Herzmuskel-, Hirn- und Hodengewebe eine Überexpression, während dieselben adulten Gewebe HER4-unterexprimiert waren.<sup>157</sup> Eine Überexpression wurde in verschiedenen Malignomen einschließlich Mammakarzinomen und Medulloblastomen beobachtet, eine zunehmende Expression von früh-proliferativen bis zu sekretorischen Phasen in Drüsengeweben, eine Unterexpression in Plattenepithel- und

Prostatakarzinomen. HER4 ist eher in differenziertem Gewebe vorzufinden.<sup>50,157</sup> In normalem Brustdrüsengewebe dominiert die Cytoplasmafärbung, aber auch eine nukleäre Färbung wurde beobachtet.

Auch im Mammakarzinom dominiert die Cytoplasmafärbung, wobei auch eine heterogene Membran- und Kernfärbung beobachtet wurde.<sup>74</sup> Mikroskopisch sind membran- und kerngefärbte Tumornester inmitten von rein cytoplasmatisch gefärbtem Tumorgewebe zu sehen. In Mammakarzinomen findet sich eine HER4-Überexpression in 7 bis 58 %.<sup>33,74,156,162,165,182</sup> Generell zeigen Mammakarzinome eine geringere HER4-Expression verglichen mit dem normalem Brustdrüsengewebe.<sup>5,74,156,163</sup> Folgende Zusammenhänge sind in mehreren Studien übereinstimmend belegt worden:

- 1) Im Gegensatz zu HER1 bis 3 ist ein positiver HER4-Status mit einer verlängerten Überlebenszeit assoziiert.<sup>80,120,164,182</sup>
- 2) Ein positiver HER4-Status ist mit einem positivem ER-Status assoziiert.<sup>5,80,120,162,165</sup>
- 3) Es besteht ein Zusammenhang mit einem niedrigen Tumorgrading.<sup>74,120,156,164,182</sup>
- 4) HER4 scheint überzufällig häufig zusammen mit HER3 aufzutreten.<sup>74,120,156</sup>

Eine HER4-Genamplifikation ist mit 13 % seltener als eine HER2-Genamplifikation.<sup>179</sup> Die Beziehung zwischen Amplifikation und Expression ist noch unklar.

## 1.3 Wachstumsfaktorrezeptoren als therapeutischer Angriffspunkt

### 1.3.1 Prinzipien der Immuntherapie

Den Einsatz von tumorantigen-spezifischen monoklonalen Antikörpern in der Therapie von Malignomen bezeichnet man als passive Immuntherapie. Im Unterschied zu einer herkömmlichen Chemotherapie ist das Ziel einer Immuntherapie die selektive und daher nebenwirkungsarme Abtötung von Tumorzellen. Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen stellen optimale Angriffspunkte für eine derartige Therapieform dar.

Monoklonale Antikörper konkurrieren mit den Liganden um Rezeptorbindung, inhibieren autokrine und parakrine Wachstumsfaktorwege und induzieren Rezeptordimerisation und Downregulation.<sup>4</sup> Dies führt zu einer reversiblen oder irreversiblen Blockade von einem, zweien oder allen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche.

Das bekannteste Beispiel ist der 1998 zugelassene Antikörper *Trastuzumab* (Herceptin<sup>®</sup>, Genentech, South San Francisco, CA). Die Grundlage für die klinische Anwendung des gegen den extrazellulären Anteil des HER2-Rezeptors gerichteten Antikörpers in der Therapie des Mammakarzinoms war die damit zu beobachtende Wachstumshemmung von HER2-überexprimierenden Tumorzellen in vitro und in Tiermodellen<sup>56,62,105,160</sup> sowie die Entdeckung mausspezifischer monoklonaler Antikörper (murine monoclonal antibody = mAb)<sup>7,27-29,34</sup> und humaner anti-Maus Antikörper (human anti-mouse antibodies = HAMA). Um eine Sensibilisierung des Immunsystems durch die Applikation eines artfremden Eiweißes zu verhindern, wurde die HER2-bindende hypervariable Region des Mausantikörpers gentechnologisch in ein menschliches IgG-Molekül eingefügt (humanized mAb, recombinant humanized monoclonal antibody = rhuMAb-HER2, *Trastuzumab*, Herceptin<sup>®</sup>).<sup>14</sup>

Ein weiteres Beispiel ist *Cetuximab* (Erbix<sup>®</sup>, ImClone Systems, New York, NY),<sup>76</sup> ein chimärer<sup>b</sup> (human-muriner) von Goldstein et al.<sup>46</sup> produzierter monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von EGFR. Der 2004 zugelassene Antikörper gegen EGFR<sup>106</sup> hat eine beeindruckende Aktivität in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie bei der Anwendung in HER1-überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen gezeigt.

Der komplett humanisierte Antikörper *ABX-EGF* (Abgenix, Fremont, CA) ohne immunogene Komponente richtet sich mit hoher Affinität und Spezifität gegen EGFR. Die völlige Eradikation von Tumorzelllinien und die Suppression von Mammakarzinomzellen *in vitro* ist gelungen.<sup>186</sup> Interessanterweise schützte *ABX-EGF* mit Krebszellen geimpfte Mäuse vor soliden Tumoren.<sup>185</sup>

**Tyrosinkinaseinhibitoren:** Ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt ist die Blockade der Tyrosinkinasephosphorylierung auf intrazellulärer Ebene und damit die Inaktivierung der darauf folgenden rezeptorgesteuerten Signalwege durch sogenannte Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Durch den intrazellulären Angriffspunkt ist die in Mammakarzinomen anzutreffende verkürzte mutante Form EGFR vIII, die keine extrazelluläre Domäne besitzt, erreichbar. In Europa und den USA zugelassene Substanzen, die spezifisch HER1-Kinasen hemmen sind *Gefitinib* (Iressa<sup>®</sup>, AstraZeneca, Macclesfield, UK) und *Erlotinib* (Tarceva<sup>®</sup>, OSI Pharmaceuticals, Tarrytown, NY). In klinischer Prüfung befinden sich Tyrosinkinaseinhibitoren, die gleichzeitig HER1- und HER2 hemmen: *PKI-166* und *GW-2016* und solche die alle vier HER-Rezeptoren hemmen (pan-HER TKI): wie *CI-1033* (Pfizer, New York, NY).<sup>4,121</sup>

### 1.3.2 Bestimmung des HER-2/*neu*-Status

Durch die Zulassung des humanisierten Antikörpers *Trastuzumab* (Herceptin<sup>®</sup>) für die Behandlung von HER-2/*neu* überexprimierenden metastasierten Mammakarzinomen hat sich für die Bestimmung des HER-2/*neu*-Status eine spezielle Indikation mit therapeutischer Konsequenz ergeben. Die Diskussion um die Auswahl der besten HER2-Nachweismethode, einschließlich Standardisierung und Grenzwertfestlegung, ist bis heute noch nicht abgeschlossen. Prinzipiell ist ein Nachweis auf Gen-, mRNA- oder Proteinebene denkbar. Bewährt haben sich zur retrospektiven Analyse am paraffinierten Material die Immunhistochemie (IHC) zur Detektion

---

<sup>b</sup> Chimär bedeutet von verschiedenen Wesen stammend. Ein chimärer Antikörper hat die gesamten variablen Immunglobulinomänen, die für die Antikörperspezifität verantwortlich sind von der einen Spezies, und die konstanten Anteile von einer anderen Spezies.

einer Proteinüberexpression und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Erfassung einer Genamplifikation. Die Spezifität und Sensitivität sowie die Vergleichbarkeit dieser beiden Methoden ist noch nicht endgültig geklärt, nicht zuletzt, da der Nachweis auf unterschiedlichen Ebenen erfolgt. Sowohl eine HER2-Überexpression ohne nachweisbare Genamplifikation als auch HER-2/*neu*-genamplifizierte Mammakarzinome ohne nachweisbare Rezeptorüberexpression wurden beschrieben, wenn auch in geringer Fallzahl. In der Regel zeigen IHC und FISH eine Konkordanz von etwa 80 %.<sup>57,67,144</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass immunhistochemisch stark positive Fälle (Score 3+) immer eine hohe Genamplifikation aufweisen. Dagegen sind schwach positive (2+) nur in 25 % der Fälle mit einer Genamplifikation assoziiert.<sup>91</sup> Dadurch ist zur Zeit folgendes klinisches Vorgehen sinnvoll: Die Bestimmung des HER-2/*neu*-Status erfolgt mittels Immunhistochemie nach den Bewertungskriterien gemäß FDA<sup>c</sup> HercepTest<sup>®</sup>-Score (Dako). Im Falle einer negativen (0 bzw. 1+, ohne therapeutische Konsequenzen) oder stark positiven Bewertung (3+, gute Ansprechrate auf Herceptin<sup>®</sup>) ist eine FISH-Analyse nicht nötig. Bei schwach positiver Reaktion (Score 2+) schließt sich eine FISH-Untersuchung an, um eine Genamplifikation nachzuweisen – nicht zuletzt deshalb, weil Patientinnen mit schwach positivem Score in der Immunhistochemie und nachgewiesener Genamplifikation in der FISH die gleiche klinische Ansprechrate auf Herceptin<sup>®</sup> zeigten wie Patientinnen, deren Karzinom ein stark positives Ergebnis zeigte.<sup>104,178</sup> Die beiden letzten Fälle stellen derzeit die am besten begründbare Grundlage für eine Therapie mit dem spezifischen Antikörper Herceptin<sup>®</sup> dar. Es sei aber darauf hingewiesen, dass in Europa Herceptin<sup>®</sup> derzeit außerhalb von Studien nur bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und einem immunhistochemisch stark positivem Ergebnis zugelassen ist.

Gegenwärtig ist der HercepTest<sup>®</sup> der Firma DakoCytomation das einzige verfügbare standardisierte, bei der FDA zugelassene Verfahren zum immunhistochemischen Nachweis einer HER-2/*neu*-Überexpression.

---

<sup>c</sup> United States Food and Drug Administration. Die in den USA gängige, in Europa nicht übliche Praxis, daß Diagnostika von der FDA geprüft werden, hat dazu geführt, daß mit der Zulassung von Herceptin<sup>®</sup> im September 1998 auch das standardisierte Testkit HercepTest<sup>®</sup> einschließlich Score der Firma DakoCytomation zugelassen wurde.

### 1.3.3 Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab

Die extrazelluläre Domäne des HER-2/*neu*-Rezeptors ist das Zielmolekül für *Trastuzumab* (Herceptin®). Die derzeit vorliegenden Daten belegen eindeutig seine Wirksamkeit. Allerdings profitieren nur Patientinnen mit HER2-Genamplifikation oder HER2-Überexpression im Karzinomgewebe von einer Behandlung mit *Trastuzumab*.<sup>19,150,177,178</sup> Der klinische Benefit scheint um so größer zu sein, je früher *Trastuzumab* in der Therapie des metastasierten Krankheitsverlaufes gegeben wird.<sup>10</sup>

*Trastuzumab* wirkt durch:

- 1) die Internalisierung und den Abbau des HER2-Rezeptors in Mammakarzinomzelllinien.<sup>6,151</sup> Die Downregulation unterbricht die Rezeptordimerbildung und die PI3-Signalkaskade (Phosphatidylinositol-3 Kinase).<sup>184</sup>
- 2) Hemmung des Zellzyklus in der G1-Phase durch Induktion des cdk-Inhibitors p27 (cdk: cyclin-dependent kinase). Dies führt zu einer Proliferationshemmung.<sup>87,88,151</sup>
- 3) Hemmung der Angiogenese durch Induktion von Antiangiogenesefaktoren und Hemmung proangiogenetischer Faktoren.<sup>66</sup>
- 4) Aktivierung Antikörper-vermittelter Zelltoxizität durch Stimulation natürlicher Killerzellen<sup>14,18,94</sup> sowie
- 5) Hemmung der proteolytischen Spaltung der extrazellulären HER2-Domäne.<sup>107</sup>

Die Resistenz HER2-überexprimierender Karzinome gegenüber einer Chemotherapie, insbesondere mit Taxol, scheint durch Kombination mit *Trastuzumab* aufgehoben. Nach einem Erklärungsmodell von Yu et al.<sup>189</sup> wird die durch Taxol induzierte Apoptose aufgrund einer HER2-induzierten Hochregulation des cdk-Inhibitors p21 gestört, da p21 die zur Apoptose erforderliche Aktivierung der Kinase p34 durch Taxol hemmt. Durch Blockade von HER2 wird dieser Vorgang rückgängig gemacht und die Apoptose wieder ermöglicht.

Die Ansprechrate einer Herceptin®-Monotherapie liegt in der metastasierten Situation zwischen 12 und 40%.<sup>8,19,178</sup> Slamon et al.<sup>150</sup> zeigten, dass *Trastuzumab* in Kombination mit einer Chemotherapie im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie das mediane Gesamtüberleben, die progressfreie Zeit und die Ansprechdauer signifikant verlängerte. Als schwerste

Nebenwirkung einer Therapie mit *Trastuzumab* sind in etwa 10 % der Fälle ernste Herzfunktionsstörungen, wie die Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion, Tachykardie und Kardiomyopathie, insbesondere in Kombination mit Anthrazyklinen bei Patientinnen mit kardiopulmonalen Vorerkrankungen, beobachtet worden.<sup>19,149,150</sup> Die Ursache ist noch unklar. In solchen Fällen sind Kombinationen ohne Anthrazykline vorzuziehen.<sup>99</sup> Auch in der second- und third-line Monotherapie wurden Ansprechraten von 15 % erreicht.

Die Effizienz von *Trastuzumab* in der Therapie von Hirnmetastasen ist noch nicht eindeutig belegt, obwohl es eine hohe Inzidenz von Hirnmetastasen in HER2-positiven Mammakarzinompatientinnen gibt. Es gibt Hinweise, dass auch unter einer offensichtlich effektiven *Trastuzumab*-Therapie eine neu aufgetretene ZNS-Metastasierung nicht selten ist. Die verminderte Wirksamkeit könnte über die fehlende Penetration des Antikörpers durch die Blut-Hirn-Schranke oder die Abnahme der HER2-Expression in Hirnmetastasen erklärt werden.<sup>38</sup>

Vielversprechend ist die *Trastuzumab*-Gabe in der adjuvanten Therapie, die Ergebnisse großer randomisierter prospektiver Studien stehen noch aus.

## 1.4 Fragestellung

Eine hämatogene Metastasierung ist das prognostisch entscheidende Ereignis für den Krankheitsverlauf und damit das Schicksal einer Brustkrebspatientin, da mit Auftreten einer Fernmetastasierung die Erkrankung unheilbar ist. Obwohl der Ausbau der Immuntherapie als Gegenstand der Forschung schon wesentliche Erkenntnisse im Sinne einer Tumorstadiumshemmung und verbesserten Gesamtprognose brachte, profitieren derzeit nicht alle Patientinnen von diesen Fortschritten. Gerade im metastasierten palliativen Stadium ist daher eine potente und gleichzeitig nebenwirkungsarme Therapieform essentiell. Die Therapieentscheidung hinsichtlich einer Herceptin®-Immuntherapie basiert derzeit ausschließlich auf dem Rezeptornachweis im Primärtumor. Eine Änderung des Rezeptorverhaltens im Rahmen der Fernmetastasierung erscheint möglich, wird derzeit jedoch nicht berücksichtigt.

In dieser Arbeit wurden die Typ I-Wachstumsfaktoren HER1 bis 4 an Mammakarzinomen und deren korrespondierenden Metastasen immunhistochemisch, die HER2-Genamplifikation durch FISH sowie die klinischen Parameter retrospektiv ermittelt. Dabei wurden folgende Sachverhalte untersucht:

- 1) Gibt es eine Expressionsänderung der Rezeptoren HER1 bis 4 vom Primärkarzinom zur korrespondierenden Fernmetastase?
- 2) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression mehrerer Rezeptoren untereinander bei den Primärkarzinomen und davon unabhängig bei den Metastasen?
- 3) Wie verhalten sich die Rezeptoren im Vergleich zu den klinischen Parametern TNM-Status, Grading, Hormonrezeptorstatus, Wachstumsfraktion und Histotyp in Primärkarzinom und Metastase?
- 4) Welchen Einfluss hat die Expression von HER1, HER2, HER3 und HER4 in Primärkarzinom und Metastase und die klinischen Parameter auf das metastasenfreie Überleben, das Überleben nach Metastasierung und das Gesamtüberleben?