

Prognostische Relevanz der Amplifikation der Onkogene c-erb B-2 und c-myc beim Mammakarzinom

The prognostic relevance of the amplification of the oncogenes c-erb B-2 and c-myc in breast cancer

B. Brandt, U. Vogt und G. Assmann

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Westf. Wilhelms-Universität Münster (Dir.: Prof. Dr. G. Assmann)

Zusammenfassung:

Parameter der Tumorbiologie haben als Kriterien für die Prognose des primären Mammakarzinoms und für die Therapiewahl Eingang in die Klinik gefunden. Mit der Entdeckung von Onkogenen und ihrer Mutationen wurden neue spezifische Parameter für eine Individualisierung von Prognose und konventioneller Therapie erhalten. An 128 primären Mammakarzinomen ermittelten wir die Amplifikation der Onkogene erb B-2 und c-myc mit einer von uns entwickelten Methode der differentiellen Polymerasekettenreaktion (PCR). 29% der Tumoren waren T1, 43% waren Östrogenrezeptor positiv und 48% der Patientinnen N-. 41% prämenopausal. Die Länge des metastasenfreien Intervalls war negativ korrielt mit einer erb B-2 Amplifikation (> 3 , $p < 0.05$) im gesamten Patientengut, bei Patientinnen, die adjuvant eine Chemotherapie (CMF) erhielten und bei prognostisch günstigen postmeno-pausalen Patientinnen. Patientinnen mit Tumoren mit c-myc Amplifikationen (> 3) hatten ein verkürztes Gesamtüberleben ($p < 0.05$) und verstarben früher nach adjuvanter Chémotherapie ($p < 0.05$). Keine Korrelationen bestanden für beide Onkogene zur Tumorgröße, zum Lymphknotenstatus, zum Hormonrezeptorstatus und zum histologischen Typ. Die Studie zeigt, daß Amplifikationen der Onkogene erb B-2 und c-myc in primären Mammakarzinomen die Identifikation von "high-risk" Patientinnen ermöglicht und damit innerhalb dieses Kollektivs neue Therapieentscheidungen erforderlich machen könnte.

Schlüsselwörter:

Onkogene – c-erb B-2 – c-myc – Mammakarzinom – Prognose – Hochrisikopatientinnen – differentielle Polymerasekettenreaktion

Summary:

Consensus meetings in Europe have agreed on the use of the prognostic factors node involvement, estrogen receptor status and menopausal status in deciding on therapeutic strategies. Gene amplification is one mechanism of oncogene activation which develops during invasion and metastasis. We have used the differential polymerase chain reaction to identify amplification of the erb B-2 and c-myc oncogenes in 128 primary breast carcinomas. Data were evaluated using Kaplan-Meier lifetable analysis in the Wilcoxon test. The presence of more than 3 copies of erb B-2 was significantly correlated with shorter disease-free survival of patients with both primary and metastatic tumors. Amplification of c-myc was significantly correlated with decreased overall survival of both patient groups. Patients receiving adjuvant chemotherapy (CFMV regime) and combined chemotherapy and radiotherapy in whom erb B-2 was amplified relapsed more quickly. Amplification of c-myc in this group was associated high-risk patients among those who were clinically at low risk. Thus metastatic disease developed more quickly in patients with erb B-2 amplification who had otherwise good clinical prognostic factors, e.g. positive progesterone receptor status and who were postmeno-pausal. Larger studies confirmed our conclusion that amplification of erb B-2 identifies patients with a poor prognosis who are unlikely to benefit from adjuvant chemotherapy.

Keywords:

Oncogenes – c-erb B-2 – c-myc – breast cancer – prognosis – high risk patients – differential PCR

Einführung

Unser noch junges Wissen über die Funktion und Struktur von Onkogenen hat tiefere Einblicke in die Entstehung und Ausbreitung von Krebskrankungen gebracht. 1983 erschien die erste Publikation über die Amplifikation des myc-Onkogens in einem humanen Tumor (1). Die Bedeutung der Amplifikation des c-myc für das Mammakarzinom zeigte sich in einer ersten Untersuchung von Escot et al. 1982 (2). Ein Drittel der untersuchten Tumoren wiesen eine Kopienzahl des c-myc-Onkogens zwischen 2 und 15 auf. Sie gehörten alle zum histologischen Typ der invasiven duktalen Karzinome. In klinischen Studien wurden diese ersten Ergebnisse belegt und eine positive Korrelation zwischen der Amplifikation des c-myc und der Progredienz der Erkrankung und der Überlebenszeit sowohl für das nodal-positive als auch für das nodal-negative Mammakarzinom festgestellt (3, 4). Das Expressionsprodukt des c-myc Onkogens wird in Tumoren mit Amplifikationen überexprimiert. Es stellt ein kernständiges Phosphoprotein dar und wird für die Zellproliferation benötigt. Fehlt das myc-Protein, wird die Zelle dem Zellteilungszyklus entzogen. Über die Funktion des myc-Proteins ergibt sich eine Beziehung zu einem weiteren Onkogen für das Mammakarzinom, dem c-erb B-2. Das Expressionsprodukt des c-erb B-2 Gens stellt einen dem Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) verwandten Membranprotein dar. In einer Tumorzelllinie wurde eine negative Regulation des c-erb B-2 über das myc-

Amplifikation und Überexpression für die Prognose des nodal-positiven Mammakarzinoms nach (6). Kontrovers wird die klinische Relevanz des c-erb B-2 für das nodal-negative Mammakarzinom in der Literatur diskutiert (7, 8, 9, 10). Es überwiegen allerdings die Aussagen, daß das c-erb B-2 für das nodal-negative Mammakarzinom keine prognostische Bedeutung hat. Die Ergebnisse der internationalen (Ludwig) Brustkrebs Studiengruppe (10) mit 1506 Paqtienten belegen hingegen einen negativen prädiktiven Wert der c-erb B-2 Expression im Karzinomgewebe für das Ansprechen auf Polychemotherapie, sowohl für das nodal-positive als auch für das nodal-negative Mammakarzinom. Daß mit Hilfe der c-erb B-2 Amplifikation bzw. Überexpression Subgruppen mit hohem Risiko in Patientenkollektiven mit ansonsten günstigen Prognosefaktoren identifiziert werden konnten, ergeben die Studien von Paik (11) und Allred (12). Paik fand, daß Patientinnen mit Tumoren mit dem Malignitätsgrad I und einer c-erb B-2 Überexpression ein verkürztes krankheitsfreies Intervall hatten. In der Gruppe der nodal-negativen Patientinnen mit T1/2, estrogenrezeptor-positiven Tumoren in der Studie von Allred waren wenige mit einer c-erb B-2 Amplifikation, die jedoch ein sehr kurzes rezidivfreies Intervall hatten.

Wir stellen in dieser Arbeit den Nachweis der Genamplifikationen der Onkogene c-erb B-2 und c-myc mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) als Prognosefaktoren des Mammakarzinoms vor (13, 14). Für diesen Ansatz im Gegensatz zur Bestimmung der Proteine spricht die

Stabilität des Analyten DNA, die hohe Nachweisempfindlichkeit der PCR und die Malignomspezifität der Genamplifikation. In Normalzellen konnte bislang keine Genamplifikation induziert werden (15). Die Methode erlaubt die semiquantitative Bestimmung der mittleren Kopienzahl der Onkogene c-erb B-2 und c-myc im Tumorgewebe. Beide Onkogene sind unter gleichen Reaktionsbedingungen in kurzer Zeit bestimmbar, so daß ein Einsatz dieser Methode in Zukunft in der klinischen Routinediagnostik zur Sicherung der Malignität von Resektionsmaterial und zur Prognose als Entscheidungskriterium für die adjuvante Therapie ermöglicht sein wird.

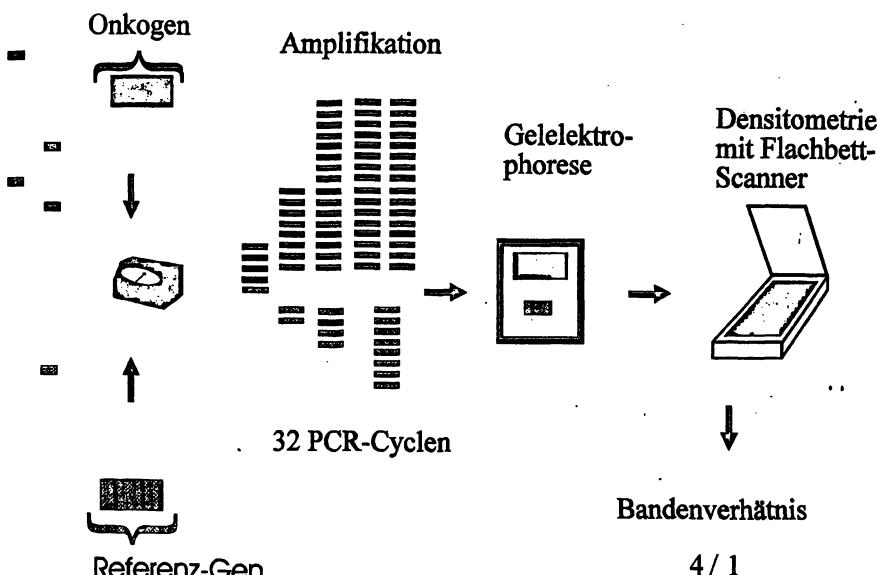
Patienten und Methoden

Abb. 1: Differentielle PCR an Mammakarzinom-Proben mit Amplifikation

Protein beobachtet. Denis Slamon berichtete 1987 über eine Pilotstudie in der er eine negative Korrelation zwischen dem Grad der Amplifikation des c-erb B-2 Genes und dem krankheitsfreien Intervall und der Überlebenszeit nodal-positiver Brustkrebspatientinnen nach operativer Therapie feststellte (5). Er lies dieser Arbeit 1989 eine zweite umfangreichere folgen. An 526 Mammakarzinomen weist er darin die Bedeutung der c-erb B-2

Patientenkollektiv

Wir haben die Bestimmung der Onkogenamplifikation von c-erb B-2 und c-myc mit Hilfe der differentiellen PCR an 128 primären Mammakarzinomen durchgeführt. Das durchschnittliche Follow-up betrug 26 Monate. Das Staging ergab, daß 68% der Tumoren T1 bzw. T2 waren

und 32% T3/T4. Nodal-negativ waren 48%, nodal-positiv 52%. Das Grading ergab, daß 46% der Tumoren G1 oder G2 waren, während 37% G3 waren (14% waren ohne Grading), 14% der Tumoren wiesen bereits zum Zeitpunkt der Primärtherapie eine Fernmetastasierung auf. 43% der Tumoren waren östrogenrezeptor-positiv (Grenzwerte > 10 fmol/mg) und 37% waren progesteronrezeptor-positiv (Grenzwert > 10 fmol/mg). 41% der Patientinnen waren prämenopausal.

Standardprotokoll differentielle PCR (Abb. 1)

Sämtliche Untersuchungen wurden aus kryokonserviertem histologisch gesichertem Tumormaterial durchgeführt. Die DNA wurde dabei nach einer phenolfreien Standardmethode (Isoquick, BTS) isoliert. Die PCR wurde in einem Ansatz von 50 µl durchgeführt. Dabei wurden 100 ng – 1 mg genomische DNA aus den Tumoren eingesetzt. Die Konzentration der Primer betrug 0,25 nmol/l. Die Konzentration der Nukleotide 200 nmol/l, die Aktivität der Taq-Polymerase war 1 U/Ansatz. Es wurden insgesamt 32 Zyklen durchgeführt in folgenden Schritten: Denaturierung 1 Min. 94°, Annealing 1 Min. 62°, Extension 1 Min. 72°. Zum Einsatz in einem Reaktionsgefäß kamen äquimolare Mengen des Primerpaars gegen c-erb B-2 (Exon 5, P1: 24 bp, P2: 23 bp) bzw. c-myc (Exon 3, P1: 23 bp, P2: 24 bp) und jeweils 1 Referenzgen, in unserem Falle gegen β-Globin (P1: 24 bp, P2: 23 bp). Die Länge der PCR-Produkte betrug 116 bp für das erb B-2 und 108 bp für das c-myc, die des Referenzgens 248 Basenpaare. Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde anschließend auf ein 20%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt. Die Auswertung des gefärbten und fixierten Gels wurde mit einem Digitalscanner durchgeführt und mit einem Softwareprogramm die Intensität der Bande für das Onkogen und die Intensität der Bande für das Referenzgen ermittelt (Scanpack, Biometra, Göttingen). Aus dem Flächenintegral dieser beiden Banden wurde der Quotient ermittelt, der ein Maß der mittleren Kopienzahl des Onkogens im Tumorgewebe darstellt. Das Standardprotokoll der differentiellen PCR dauert ca. 4 Stunden.

Der Variationskoeffizient in der Serie für die Bestimmung des erb B-2 betrug 17,5% und der für das c-myc 12,2% für die Durchführung des Standardprotokolls mit 32 Zyklen PCR bei einer Annealingtemperatur von 62° bezogen auf

eine durchschnittliche Kopienzahl von 1. Der Variationskoeffizient wurde an Leukozyten- und Mammatumorkulturzellen-DNA (MCF-7, Sk Br3) ermittelt (Tab. 1).

Aufgrund der Präzision der Methode haben wir die ermittelten Quotienten semiquantitativ ausgewertet. Dabei wurde ein Quotient von < 3 als „nicht amplifiziert“ gewertet. „Mäßig amplifiziert“ wurde angegeben bis < = 10, und > 10 „stark amplifiziert“.

Biomathematische Methoden

Eine Korrelationsanalyse mit klinischen und biochemischen Faktoren führten wir mit Hilfe des Chi²-Quadrat-Tests und des Wilcoxon-Tests durch. Mit der Lifetable Analyse nach Kaplan-Meier wurde die Beziehung zwi-

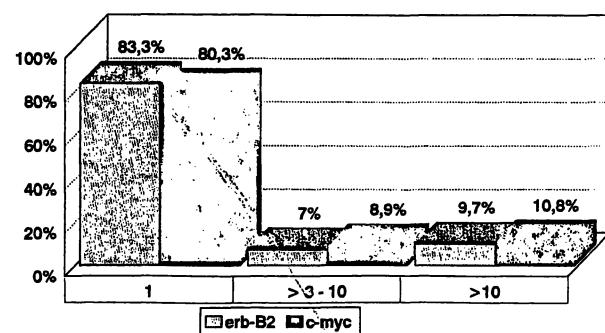


Abb. 2: Onkogenamplifikationen; Primäre Tumoren (n = 128)

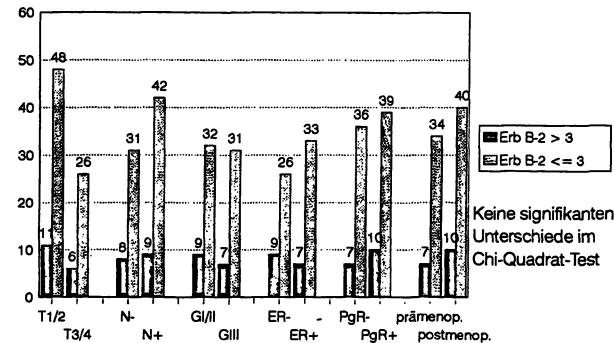


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung von Staging, Grading und Hormonrezeptorstatus bezogen auf die erb-B2 Prognosegruppen

schen Genamplifikation und krankheitsfreiem Interval bzw. Überlebenszeit ermittelt.

Ergebnisse

A. Genamplifikationen des c-erb B-2

Es ergab sich in unserem Kollektiv, wie in Abbildung 2 ersichtlich, folgende Verteilung der Amplifikationen für das erb B-2: 83,3% der Tumoren waren nicht amplifiziert, 7% mäßig amplifiziert und 9,7% stark amplifiziert.

Tab. 1: Variationskoeffizienten der differentiellen PCR in Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen

Zyklen	VK erb B-2	VK c-myc
29	29,0	19,5
30	24,0	15,8
32	17,5	12,2
34	23,6	11,8

Originalie

Mit Hilfe des Chi²- und des Wilcoxon-Tests wurden in unserem Patientenkollektiv keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen dem Grad der Amplifikation von c-erb B-2 den Parametern Tumogröße, Nodalstatus, histomorphologisches Grading, Estrogen- und Progesteronrezeptor nachgewiesen. Die Abbildung 3 ergibt eine Zusammenfassung der statistischen Analyse.

Anhand der klinischen Verläufe wurde mit den Onkogen-amplifikationen eine univariate statistische Analyse des krankheitsfreien Intervalls und der Überlebenszeit nach operativer Primärtherapie nach Kaplan-Meier durchgeführt. Sie ergab für das c-erb B-2 einen Zusammenhang mit dem krankheitsfreien Überleben der Patienten. Patienten mit mäßiger oder starker Amplifikation des c-erb B-2 zeigten ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben. Nahezu alle Patienten mit einer Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Primärtherapie hatten eine mäßige oder starke c-erb B-2 Genamplifikation ($p < 0.05$).

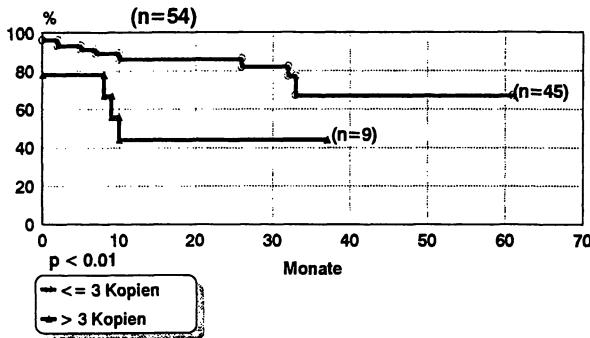


Abb. 4: Erb B-2 Amplifikation und krankheitsfreies Intervall postmenopausaler Patientinnen

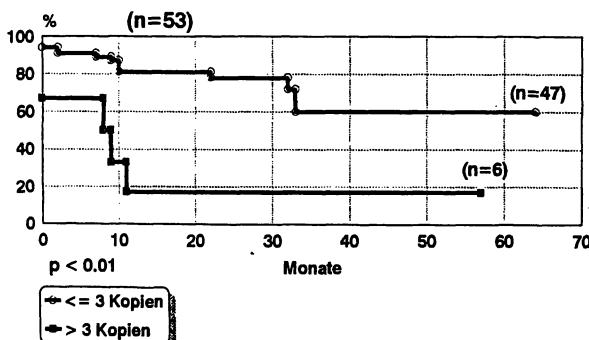


Abb. 5: Erb B-2 Amplifikation und krankheitsfreies Interval nach CMF-Therapie

In der prognostisch günstigen Gruppe der postmenopausalen Patientinnen fand sich eine prognostisch weniger günstige Gruppe mit einem signifikant kürzeren krankheitsfreien Intervall, die eine c-erb B-2 Amplifikation aufwies ($p < 0.01$) (Abb. 4). Der Erfolg einer adjuvanten Chemotherapie (CMF-Therapie) korrelierte mit der Amplifikation des c-erb B-2. Patientinnen, die im Primärtumor mäßig oder starke Amplifikation des c-erb B-2 Onkogens

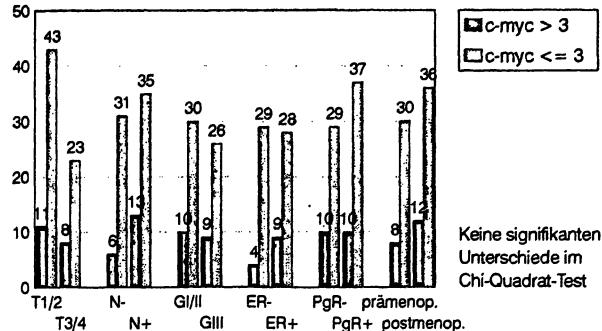


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung von Staging, Grading und Hormonrezeptorstatus bezogen auf die c-myc Prognosegruppen

aufwiesen, hatten unter adjuvanter Therapie einen signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall, als Patienten die keine Amplifikationen des c-erb B-2 aufwiesen ($p < 0.01$) (Abb. 5).

B. Genamplifikationen des c-myc

80,3% der Tumoren hatten keine, 8,9% hatten eine mäßige und 10,8% eine starke c-myc Amplifikation (Abb. 2).

Der Grad der Amplifikation des c-myc korreliert in unserem Untersuchungsgut nicht mit der Tumogröße, dem Nodalstatus, dem histomorphologisches Grading, sowie dem Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Die Abbildung 6 gibt eine Zusammenfassung der Analyse. Eine statistische Analyse des krankheitsfreien Intervalls bzw. der Überlebenszeit nach operativer Therapie wurde auch für das c-myc durchgeführt. Für das c-myc ergab sich ein Zusammenhang zwischen der Amplifikation des c-mycs und der Überlebenszeit der Patientinnen. Patientinnen mit einer mäßigen oder starken c-myc Amplifikation hatten ein signifikant kürzeres Überleben nach Primärtherapie als Patientinnen, die Tumoren ohne eine Amplifikation des c-myc aufwiesen ($p < 0.05$).

Für die Patientinnengruppe mit einer c-myc Amplifikation ergab sich eine signifikant kürzere Überlebenszeit. Die Überlebenszeit der nodal-positiven Patientinnen nach adjuvanter Therapie, die eine mäßige oder starke Amplifikation des c-myc Onkogens aufwiesen, war signifikant kürzer, als das der Patientinnen, die keine Amplifikation des c-myc Onkogens aufwiesen ($p < 0.05$).

C. c-erb B-2 und c-myc Amplifikationen

Nur 7% der von uns untersuchten Tumoren wiesen sowohl eine c-erb B-2 als auch eine c-myc Amplifikation auf. Das bedeutet 35% der Tumoren hatten eine Onkogen-amplifikation. Eine Korrelation zwischen dem Grad der Amplifikation der beiden Gene konnte von uns mit Hilfe des Chi²-Tests nicht festgestellt werden. Die Gruppe der Patientinnen mit Tumoren, die beide Gene amplifiziert hatten, ist aufgrund der selten auftretenden Koamplifikation der beiden Onkogene für eine Validierung der Prognose noch zu klein.

Diskussion

Amplifikationen des c-erb B-2 und des c-myc Onkogens sind relativ häufige Ereignisse in Mammakarzinomen. Wir fanden in unserem Patientenkollektiv in 16,7% der Fälle eine c-erb B-2 und in 19,7% eine c-myc Amplifikation. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Berns et al. an 1052 Tumorgeschwülsten, in den 15,1% eine c-erb B-2 und 16,1% eine c-myc Amplifikation hatten (3). In nur 7% der Gewebe mit Amplifikationen wurde von uns beide Gene in erhöhter Kopienzahl gefunden. Die Anzahl der Kopien, ermittelt mit Southern Blotting, wird für das c-erb B-2 in der Literatur zwischen 3 und 43 und für das c-myc zwischen 3 und 18 angegeben (3, 4). In unserem Kollektiv konnten wir eine ähnliche Verteilung feststellen. Das Maximum für das c-erb B-2 lag bei 50 und für das c-myc bei 30 bezogen auf die Kopie des β-Globins als Referenzgen. Die genannte Studie von Berns beschreibt wie andere Autoren eine negative Korrelation zwischen dem Grad der c-erb B-2 Amplifikation und dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (3), den wir nicht bestätigen können. Die Amplifikationsgrade mäßig ($> 3 <= 10$) und stark (> 10) waren in unserer Untersuchung nicht mit dem Nodalstatus, der Tumogröße und dem histomorphologischen Grading korreliert. In den Studien einiger anderer Autoren wird von einer positiven Korrelation zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknoten und dem Grad der c-erb B-2 und c-myc Amplifikation berichtet (5, 6). Bezogen auf die prognostische Bedeutung der Amplifikation von c-erb B-2 und c-myc ist zu sagen, daß das c-erb B-2 in unserem Patientengut lediglich mit dem krankheitsfreien Intervall negativ korreliert, das c-myc hingegen negativ mit dem Überlebenszeitraum nach operativer Therapie in Zusammenhang stand. Die in der Einleitung erwähnte große Studie der Therapiestudiengruppe unter der Leitung von A. Goldhirsch ergab sowohl für das krankheitsfreie Intervall als auch für die Überlebenszeit eine signifikante Korrelation mit dem Grad der Überexpression des c-erb B-2 (10). Auch in unserem Kollektiv konnten mit Hilfe der Bestimmung der Amplifikationen von c-erb B-2 und c-myc Hoch-Risikopatientinnen mit guten klinischen Prognosefaktoren identifiziert werden. In unserer Studie korrelierte der Erfolg der Chemotherapie negativ mit der Amplifikation des c-erb B-2 bzw. des c-myc. Für das c-erb B-2 wurde dieses Ergebnis in der internationalen Ludwig Therapiestudie ebenfalls beobachtet (10). Hier fand sich sogar ein dosisabhängiger Effekt. Die Differenz des krankheitsfreien Intervalls in der Gruppe der Patientinnen mit 6 Zyklen adjuvanter Polychemotherapie und Tumoren mit und ohne c-erb B-2 Überexpression war am größten. In zwei 1992 veröffentlichten Studien wurde eine multivariate Analyse der prognostischen Bedeutung der Amplifikation des c-myc durchgeführt. Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, daß die Amplifikation des c-myc ein unabhängiger Prognosefaktor insbesondere für das nodal-negative und östrogenrezeptor-positive Mammakarzinom ist (3, 4). Des Weiteren wiesen in unserer Studie Patienten mit klinisch günstigen Prognosefaktoren, z.B. die postmenopausalen Patientinnen mit c-erb B-2 oder c-myc Amplifikationen eine schlechtere Prognose auf. Eine Beobachtung, die bisher

in der Literatur nicht berichtet wurde. Aufgrund unserer Ergebnisse sollten die beiden Onkogene c-erb B-2 und c-myc simultan bestimmt werden. Zum einen, da in unserer Studie das c-erb B-2 mit dem krankheitsfreien Intervall des c-myc mit der Überlebenszeit korreliert, und zum anderen gehören beide einer intrazellulären Reaktionskaskade an, so daß hier komplementäre Aussagen möglich sind. Die schnelle und reproduzierbare Durchführung der differentiellen PCR zur Bestimmung der Amplifikationen von c-erb B-2 und c-myc könnte ihren Einsatz als Parameter in der Routine diagnostik des Mammakarzinoms in der Zukunft möglich erscheinen lassen.

Literatur:

1. Schwab, M.; Alitalo, K.; Klempnauer K.H. et. al. (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma tumor. *Nature* 305: 245 - 248
2. Escot, C.; Theillet, C.; Lidereau R. et al. (1986): Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4834 - 4838
3. Berns, E.M.J.J.; Klijn J.G.M.; van Putten, W.L.J. (1992): c-myc amplification is a better prognostic factor than Her²/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 52: 1107 - 1113
4. Roux-Dosseto, M.; Romain, S.; Dussault, V. (1992): c-myc Gene Amplification in selected node-negative breast cancer patients correlates with high rate of early relapse. *Eur. J. Cancer* 28A: 1600 - 1604
5. Slamon D.J.; Clark, G.M.; Wong S.G. et al. (1987): Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her²/neu oncogene. *Science* 235: 177 - 182
6. Slamon, D.J.; Godolphin, W.; Jones, L.A. et al. (1989): Studies of the Her²/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707 - 712
7. Ro, J.; El-Naggar, A.; Ro, J.Y. et al. (1989): c-erb B-2 amplification in node-negative human breast cancer. *Cancer res.* 49: 6941 - 6944
8. Paterson M.C. et al. (1991): Correlation between c-erb B-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer res.* 51: 556 - 567
9. Clark, G.M.; McGuire W.L. (1991): Follow-up of Her²/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer res.* 51: 944 - 948
10. Gusterson, B.A.; Gelber, R.D.; Goldhirsch, K.N. et al. (1992): Prognostic importance of c-erb B-2 expression in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 10: 1049 - 1056
11. Paik, S.; Hazan, R.; Fisher, E.R. et al. (1990): Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Cancer and Bowel Project: Prognostic significance of erb B-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J. clin. Oncol.* 8: 103 - 112
12. Allred, D.; Clark, G.M.; Tandon, A.; et al. (1990): Her²/neu expression identified a group of node-negative breast cancer patients at high risk for recurrence. *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.*
13. Brandt, B.; Vogt, U.; Harms, F.; Jackisch, C.; Zänker, K.S.; Assmann, G. (1992): Differential polymerase chain reaction for the detection of erb-B-2, erb-B-3, c-myc and Ha-Ras-amplification in breast cancer tissue. *Journal of Tumor Marker Oncology* 7: 32
14. Brandt, B.; Vogt, U.; Harms, F.; Jackisch, C.; Zänker, K.S.; Assmann, G. (1992): Detection of erb-B-2, erb-B-3 and c-myc-amplification in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res. Treatm.* 23: 176
15. Stark, G.R.; Debatisse, M.; Giulotto, E. et al. (1989): Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell*. 57: 901 - 908

Anschrift für die Verfasser:

Dr. Burkhard Brandt
Inst. für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Albert Schweitzer Straße 33
48129 Münster